

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LE CARBOXYMÉTHYL AMIDON DE FAIBLE À HAUT DEGRÉ
DE SUBSTITUTION : EXCIPIENT MULTIFONCTIONNEL POUR DES FORMES
PHARMACEUTIQUES À ADMINISTRATION ORALE

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR
MARC LEMIEUX

SEPTEMBRE 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

AVANT-PROPOS

Le projet de recherche portant sur les carboxyméthyl amidons (CMA) présenté dans cette thèse est le résultat d'une collaboration étroite du milieu de recherche universitaire, le laboratoire d'enzymologie et des polymères biocompatibles du Pr. Mateescu de l'Université du Québec à Montréal (UQAM) et du milieu de recherche privé, Corealis Pharma Inc. De même, au début de ce projet de recherche, l'auteur de cette thèse possédait principalement une formation académique et pratique en sciences pharmaceutiques et en ingénierie chimique. Ces conditions ont généré une dynamique de recherche multidisciplinaire dans laquelle les aspects de recherche fondamentale et appliquée ont été considérés afin d'élargir spécifiquement les connaissances sur les CMA et, selon une perspective générale, celles sur les formulations pharmaceutiques solides à administration orale. À mon sens, cette dynamique de recherche a été des plus profitables pour tous les intervenants directs de ce projet ainsi que pour le milieu de la recherche pharmaceutique et biochimique.

En ce sens, tout au long de l'approche expérimentale, une attention particulière a été portée sur le fait que les formulations pharmaceutiques, les procédés de production ainsi que les paramètres d'opérations des équipements soient les plus représentatifs de ceux utilisés dans l'industrie pharmaceutique afin que les résultats aient une portée industrielle significative tout en facilitant le processus de mise à l'échelle qui pourrait éventuellement résulter de l'utilisation à une échelle industrielle des polymères de CMA comme excipients pharmaceutiques. Dans le même ordre d'idées, les aspects biochimiques de cette recherche ont été réalisés dans le but général de développer ou d'utiliser des méthodes de caractérisation qui pouvaient par la suite être utilisées relativement facilement comme outils dans l'industrie pharmaceutique ou biotechnologies dans la découverte de nouveaux principes actifs ou de cibles thérapeutiques et à l'élaboration de formulations pharmaceutiques solides.

Cette thèse est l'accomplissement d'un travail de recherche stimulant réalisé au cours des dernières années, période dans laquelle, j'ai eu le privilège d'acquérir de nouvelles connaissances (théoriques et pratiques) dans le domaine de la biochimie et des biomatériaux. La réalisation de cette thèse fut possible grâce à la participation et au support de nombreuses personnes de mon entourage académique, professionnel et personnel.

Tout d'abord, je tiens à fortement remercier mon directeur de recherche, le Pr. Mircea Alexandru Mateescu de la confiance qu'il m'a témoignée en m'acceptant au sein de son groupe de recherche sur les biomatériaux et de m'avoir proposé ce sujet de recherche. J'aimerais aussi lui exprimer ma reconnaissance pour ses conseils, son soutien et pour la latitude dont j'ai pu disposer à l'avancement de ce projet.

De plus, je tiens à remercier fortement le Dr. Patrick Gosselin, codirecteur de recherche, de la confiance qu'il m'a accordée, pour ses précieux conseils, son soutien, son esprit d'initiative, et tout particulièrement pour son rôle de motivateur au cours ce projet de recherche.

Je remercie la Pr. Joanne Paquin pour son aimable accueil dans son laboratoire m'ayant permis la réalisation d'expérimentations, pour son expertise, son ouverture d'esprit ainsi que pour nos enrichissantes discussions.

Je ne saurais passer sous silence l'ensemble de mes confrères de l'UQAM et de Corealis Pharma Inc. et amis, avec une mention toute spéciale à Elias Assad, Aimesther Bétancourt, Frédérick Bouchard, Frédérick Byette, Richard Desmangles, Philippe Ducharme, Jo-Annie Fontaine, Bastien Landry, Yves Mouget, Roch Thibert et Yves Roy qui ont tous influencé ou contribué positivement à mon travail.

Je tiens à souligner le soutien financier du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) (bourse à incidence industrielle), celui de Corealis Pharma Inc., celui du MITACS et des Fonds de recherche nature et technologies du Québec (FQRNT) (bourse MITACS Accélération) et celui, département chimie et de la faculté des sciences de l'UQAM (bourse FARE).

Je désire aussi souligner l'assistance technique de l'ensemble du personnel technique du département de chimie-biochimie et du département des sciences de la terre de l'UQAM (Raynald Lapointe, Sylvie Lemieux, Michel Marion, Raymond Mineau et Michel Preda).

Finalement, je tiens à remercier chaleureusement les membres de ma famille pour l'appui inconditionnel sur lequel j'ai pu compter jour après jour, avec une mention particulière pour ma conjointe Stéphanie De Ladurantaye pour sa patience infinie et son support moral.

*"The true sign of intelligence
is not knowledge but imagination."*

- Einstein, Albert

*"Tout ce qu'un homme est capable d'imaginer,
d'autres hommes seront capables de le réaliser."*

- Verne, Jules

*"If knowledge can create problems,
it is not through ignorance that we can solve them"*

- Asimov, Isaac

*"Resolve never to quite, never to give up,
no matter the situation."*

- Nicklaus, Jack William

*"No matter how good you get you can always get better
And that's the exciting part!"*

- Woods, Eldrick Tont

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	ii
DÉDICACE	v
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xviii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES et ACRONYMES	xixx
LISTE DES SYMBOLES	xxiii
RÉSUMÉ	xxvii
INTRODUCTION	
LE CARBOXYMETHYL AMIDON : UN NOUVEL EXCIPIENT	
PHARMACEUTIQUE	1
Objectif général.....	5
Contenu de la thèse	5
PREMIÈRE PARTIE: ÉTAT DES CONNAISSANCES	8
CHAPITRE I	
L'ADMINISTRATION DES MÉDICAMENTS PAR VOIE ORALE.....	9
1.1 Importance de l'administration des médicaments par voie orale.....	10
1.2 Tractus gastro-intestinal.....	11
1.2.1 Anatomie, physiologie et microstructures générales	11
1.2.2 Estomac.....	17
1.2.3 Intestin grêle	20
1.2.4 Gros intestin.....	23
1.3 Biopharmaceutique et pharmacocinétique	24
1.3.1 Voies d'absorption orales des PA.....	25
1.3.2 Profils et paramètres pharmacocinétiques	29
1.3.3 Propriétés physico-chimiques et considérations biopharmaceutiques influençant la biodisponibilité des PA.....	31

1.4 Modèles <i>in vitro</i> des barrières épithéliales.....	34
1.4.1 Barrières épithéliales gastriques	36
1.4.2 Barrières épithéliales intestinales.....	38

CHAPITRE II

SYSTÈMES D'ADMINISTRATION DES MÉDICAMENTS PAR VOIE ORALE	40
--	----

2.1 Contrôle de la libération des médicaments	40
2.1.1 Formes solides à libération contrôlée	42
2.2 Systèmes matriciels hydrophiles.....	43
2.2.1 Libération des médicaments	43
2.2.2 Caractérisation des cinétiques de libération et modélisation des mécanismes de libération des médicaments	46
2.2.3 Propriétés physico-chimiques et considérations biopharmaceutiques influençant la libération des PA.	49
2.3 Les formes solides mucoadhésives	52
2.3.1 La mucoadhésion	52
2.3.2 Excipients mucoadhésifs.....	54
2.3.3 Microsphères mucoadhésives	55
2.4 Excipients pharmaceutiques multifonctionnels	56

CHAPITRE III

CARBOXYMÉTHYL AMIDON : EXCIPIENT PHARMACEUTIQUE	60
---	----

3.1 L'amidon.....	60
3.1.1 Molécules d'amidon et voies de synthèse.....	61
3.1.2 Structures des amidons	62
3.1.3 L'amidon comme excipient pharmaceutique.....	65
3.2 Dérivés d'amidon.....	66
3.2.1 Amidon pré-gélatinisé et gélatinisation	66
3.2.2 Amidon réticulé	68
3.2.3 Amidon substitué et substitution.....	69
3.3 Le carboxyméthyl amidon	70
3.3.1 Importance industrielle du carboxyméthyl amidon	70
3.3.2 Carboxyméthylation des amidons.....	71

3.3.3 Méthodes de synthèse des carboxyméthyl amidons	74
3.3.4 Carboxyméthyl amidon : excipient pour la libération contrôlée.....	76
DEUXIÈME PARTIE: PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	80
CHAPITRE IV	
PROJET DE RECHERCHE	81
4.1 Problématiques.....	81
4.2 Hypothèses de travail.....	83
4.3 Objectifs spécifiques de recherche.....	85
4.4 Contributions à la recherche	86
4.5 Approche méthodologique.....	87
4.5.1 Développement et optimisation de la synthèse des carboxyméthyl amidon par réaction diphasique en milieu organique	97
4.5.2 Détermination et optimisation de la méthode de production des microsphères de carboxyméthyl amidon	101
CHAPITRE V	
INFLUENCE DES MÉTHODES DE SÉCHAGE ET DE FAIBLES DEGRÉS DE SUBSTITUTION SUR LA STRUCTURE ET LES PROPRIÉTÉS DE LIBÉRATION DE MÉDICAMENT DU CARBOXYMÉTHYL AMIDON	105
5.1 Présentation de l'article 1.....	105
5.2 Influence of drying procedure and of low degree of substitution on the structural and drug release properties of carboxymethyl starch	107
5.2.1 Résumé	108
5.2.2 Abstract.....	109
5.2.3 Introduction.....	110
5.2.4 Materials and methods	112
5.2.5 Results and discussion	118
5.2.6 Conclusion	134
5.2.7 Acknowledgements.....	135

CHAPITRE VI	
CARBOXYMÉTHYL AMIDON RICHE EN AMYLOSE COMME EXCIPIENT POUR LA LIBÉRATION CONTRÔLÉE DE MÉDICAMENTS. ÉTUDES DES MÉCANISMES DE LIBÉRATION ET DE L'INFLUENCE DU DEGRÉ DE SUBSTITUTION	136
6.1 Présentation de l'article 2.....	136
6.2 Carboxymethyl high amylose starch as excipient for controlled drug release.	
Mechanistic study and the influence of degree of substitution.	138
6.2.1 Résumé	139
6.2.2 Abstract.....	140
6.2.3 Introduction.....	141
6.2.4 Materials and Methods.....	143
6.2.5 Results and discussion	148
6.2.6 Conclusion	165
6.2.7 Acknowledgements.....	167
CHAPITRE VII	
LIGNÉE CELLULAIRE NCI-N87 COMME MODÈLE DE LA BARRIÈRE ÉPITHÉLIALE GASTRIQUE POUR L'ÉTUDE DE LA PERMÉABILITÉ DES MÉDICAMENTS	168
7.1 Présentation de l'article 3.....	168
7.2 NCI-N87 cell line as gastric epithelial barrier model for drug permeability assay.....	170
7.2.1 Résumé	171
7.2.2 Importance de la recherche	171
7.2.3 Abstract.....	172
7.2.4 Research highlights.....	172
7.2.5 Introduction.....	173
7.2.6 Materials and methods	174
7.2.7 Results.....	177
7.2.8 Discussion.....	181
7.2.9 Acknowledgments	185
7.2.10 Supplementary material	186

CHAPITRE VIII	
MICROSPHÈRES MUCOADHÉSIVES DE CARBOXYMÉTHYL AMIDON : SYSTÈME GASTRO-RÉTENTIF D'ADMINISTRATION DE MÉDICAMENTS	187
8.1 Présentation de l'article 4.....	187
8.2 Carboxymethyl starch mucoadhesive microspheres as gastroretentive dosage form	190
8.2.1 Résumé	191
8.2.2 Abstract.....	192
8.2.3 Graphical abstract	193
8.2.4 Introduction.....	193
8.2.5 Materials and methods	195
8.2.6 Results and Discussion	203
8.2.7 Conclusion	220
8.2.8 Acknowledgments	220
CHAPITRE IX	
DISCUSSION GÉNÉRALE	221
9.1 Influence du degré de substitution, de la structure, de la méthode de synthèse et de la méthode de production des formulations	223
9.1.1 Carboxyméthyl amidons non réticulés : comprimés monolithiques	223
9.1.2 Carboxyméthyl amidons réticulés : microsphères	231
9.1.3 Carboxyméthyl amidon non réticulés vs. réticulés	234
9.2 Influence de la forme (acide ou sodique).....	234
9.3 Influence des propriétés physico-chimiques	237
9.4 Le carboxyméthyl amidon, un excipient multifonctionnel	239
9.5 La lignée cellulaire NCI-N87 comme outil <i>in vitro</i> pour l'étude de la perméabilité gastrique des médicaments et des interactions avec des formes pharmaceutiques solides	242
9.6 Portée des résultats.....	245
9.6.1 Purification des carboxyméthyl amidons.....	245
9.6.2 Sources d'amidon	247
9.6.3 Choix des principes actifs.....	248
9.6.4 De l' <i>in vitro</i> à l' <i>in vivo</i>	250

CHAPITRE X	
CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES FUTURES	251
ANNEXE A	
RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES.....	263
RÉFÉRENCES	274

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Anatomie et caractéristiques du système digestif. Organes du TGI encadrés en rouge.....	12
1.2	Résumé des processus impliqués suite à l'administration orale d'un médicament sous forme solide.	12
1.3	Muqueuses des organes de digestion et d'absorption du TGI humain.	15
1.4	A) Organisation des barrières épithéliales du TGI (adapté de Daugherty et Mrsny, 1999b) et B) jonctions cellulaires entre les cellules épithéliales	16
1.5	Jonctions serrées et jonctions d'adhérence entre les cellules épithéliales humaines	17
1.6	Muqueuse gastrique: A) crypte de l'estomac et glande gastrique, B) mécanismes de défense du mucus gastrique et C) mécanisme de sécrétion du HCl par les cellules pariétales.....	18
1.7	Muqueuses A) de l'intestin grêle et B) du gros intestin	22
1.8	Représentation schématique des interrelations entre les composantes principales des propriétés biopharmaceutiques et pharmacocinétiques	26
1.9	Voies d'absorption des PA au travers des barrières épithéliales du TGI.	29
1.10	Profil pharmacocinétique typique d'un PA administré par voie orale	31
1.11	Propriétés physico-chimiques et considérations biopharmaceutiques influençant la biodisponibilité des PA.	33
1.12	Représentation schématique d'une monocouche de cellules épithéliales cultivées sur un support perméable	35
1.13	Comparaison des barrières épithéliales <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	37
2.1	Contrôle de la libération des médicaments.....	40

2.2	Classification des formes solides à libération contrôlée. A) Système membranaire, B) système matriciel et C) système hybride.....	42
2.3	Représentation schématique de la position des différents fronts à l'intérieur d'un système matriciel hydrophile hydraté	45
2.4	Variation de l'exposant de libération purement Fickienne (m) du modèle de Peppas et Sahlin (1989)	48
2.5	Représentation schématique de la capacité de gonflement des polymères hydrophiles ioniques.....	50
2.6	PA avec fenêtre d'absorption limitée.	52
2.7	Les deux étapes dans la mucoadhésion.	53
2.8	Interactions associatives entre les glycoprotéines du mucus (mucine) et les polymères mucoadhésifs	53
2.9	Dispersion des microsphères mucoadhésives dans le TGI suivant leur administration orale.....	56
3.1	Structure chimique représentative de (A) l'amylose et (B) l'amylopectine ramifiée.....	61
3.2	Biosynthèse de l'amidon.	63
3.3	Représentation schématique des différents niveaux de structure des granules d'amidon et de l'implication de l'amylose et de l'amylopectine	63
3.4	Structures moléculaires des chaînes d'amidon.....	65
3.5	Modifications physiques, chimiques et biochimiques des amidons	67
3.6	Représentation schématique des transitions de phase séquentielles de la structure des amidons lors du phénomène de gélatinisation.....	68
3.7	Modèle simplifié de la réticulation des chaînes d'amidon au moyen de STMP	69
3.8	Applications industrielles du carboxyméthyl amidon	70
3.9	Structure chimique du carboxyméthyl amidon. Les chiffres indiquent la numérotation standard de la position des carbones sur un GU.....	73

3.10	Schéma de procédé pour la production en mode continu de CMA par réaction diphasique en milieu organique.....	75
3.11	Stabilité physique des comprimés monolithiques à base de CMA incubés dans le FGS	77
3.12	Influence a) de l'augmentation de la proportion de chlorure de sodium (NaCl) et b) du gradient de pH sur la libération de l'acétaminophène (40%) à partir de comprimés monolithiques à base de CMA (valeur de DS inconnue, 600 mg).....	79
3.13	Influence de la pancréatine (contenant de l' α -amylase) dans le FIS sur l'érosion de comprimés monolithiques à base de CMA (DS 0,33, masse comprimée 200 mg).....	79
4.1	Représentation schématique de l'approche méthodologique développée et utilisée pour étudier l'influence du DS et des méthodes de séchage des CMA (chapitre V).....	90
4.2	Représentation schématique de l'approche méthodologique développée et utilisée pour étudier l'influence du DS des CMA synthétisés par réaction diphasique en milieu organique (chapitre VI).	91
4.3	Représentation schématique de l'approche méthodologique développée et utilisée pour étudier l'influence du DS des CMA pour l'élaboration des MS-CMA (chapitre VIII).....	92
4.4	Représentation schématique de l'approche méthodologique développée et utilisée pour déterminer la faisabilité d'utiliser la lignée cellulaire NCI-N87 comme modèle <i>in vitro</i> de la barrière épithéliale gastrique (chapitre VIII).....	95
4.5	Montage expérimental utilisé pour la synthèse des CMA par réaction diphasique en milieu organique et conditions standard de réaction.	99
4.6	Gonflement des MS-CMA DS 1,0 produits par émulsion-réticulation dans (A) le FGS après 10 min et (B) le FIS après 1 min.....	102
4.7	Optimisation des paramètres de production des MS-CMA obtenues par émulsion-réticulation.....	104
5.1	X-ray diffractograms of native starch and carboxymethyl high amylose starch (CMS) obtained by solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly)	120

5.2	Relative solubility (%) of carboxymethyl high amylose starch (CMS) obtained by solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly).....	121
5.3	Scanning electron micrographs of carboxymethyl high amylose starch (CMS) obtained by solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly), at various degrees of substitution (DS)	124
5.4	TG (a) and DTG (b) thermograms of representative carboxymethyl high amylose starch (CMS) samples obtained by solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly).....	127
5.5	Physical and mechanical characteristic of direct compression tablets from carboxymethyl high amylose starch (CMS) obtained by solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly)	130
5.6	Dissolution profiles of acetaminophen (20 % w/w) from carboxymethyl high amylose starch (CMS) tablets obtained by solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly) at various degrees of substitution (DS).....	133
6.1	Actual degree of substitution (DS) and reaction yield (Y) as function of the theoretical DS of CMHAS synthesized in non-aqueous medium	149
6.2	Scanning electron micrograph of sodium CMHAS(Na) and protonated CMHAS(H) particles	152
6.3	Water content (%) of CMHAS(Na) and CMHAS(H) particles.....	155
6.4	Relative solubility (%) of CMHAS(Na) and CMHAS(H) in nanopure water (pH 7.0) and in HCl 0.1N (pH 1.0) dried powders.....	155
6.5	a) Thickness, b) crushing strength (n = 6) and c) friability (n = 2) of CMHAS(Na) and CMHAS(H) monolithic tablets (loaded with acetaminophen (20 % w/w)).....	157
6.6	Dissolution profiles of acetaminophen from CMHAS(Na) tablets in: a) simulated gastric fluid and b) pancreatin-free simulated intestinal fluid	161
6.7	Physical appearance of typical tablets of HAS _{NaOH} and CMHAS(Na) with a DS of 0.09 and 1.23 tablets incubated in SGF	162
6.8	Dissolution profiles of acetaminophen from CMHAS(H) tablets in: a) simulated gastric fluid and b) pancreatin-free simulated intestinal fluid ...	163

6.9	Dissolution profiles of acetaminophen from CMHAS(Na) tablets in simulated intestinal fluid with pancreatin (Pan, pH 6.8).....	166
7.1	Optimization of NCI-N87 cell culture conditions on porous inserts.....	180
7.2	Effect of the apical pH on the TEER of NCI-N87 monolayers.....	181
7.3	Effect of the pH gradient on the P_{app} values of model drugs across NCI-N87 monolayers.	184
8.1	Résumé graphique de l'article intitulé « Carboxymethyl starch mucoadhesive microspheres: a gastroretentive dosage form »	193
8.2	Physicochemical properties of placebo (PL) and furosemide (FU) loaded carboxymethyl starch microspheres (CMS-MS) with various degrees of substitution (DS).....	206
8.3	Carboxymethyl starch microspheres (CMS-MS) structure.	210
8.4	Drug release profiles of Furosemide (FU, 20 mg) and FU loaded into CMS-MS with various degrees of substitution (DS).....	212
8.5	Interaction of carboxymethyl starch microspheres (CMS-MS) at various degrees of substitution (DS) with gastric (NCI-N87) and intestinal (Caco-2) epithelial barrier models.	214
8.6	Furosemide (FU) transport across gastric (NCI-N87) and intestinal (Caco-2) epithelial barrier models exposed to carboxymethyl starch microspheres (CMS-MS) at various degrees of substitution (DS).	216
8.7	Mucoadhesion properties of carboxymethyl starch microspheres	219
9.1	Représentation schématique de l'influence du DS sur les propriétés structurelles des CMA sous forme de poudre synthétisés en milieu aqueux ou par réaction diphasique en milieu organique à partir d'amidon riche en amylose (Hylon VII) et des mécanismes de contrôle de la libération des médicaments à partir de comprimés monolithiques de CMA dans différents milieux de dissolution	226
A. 1	Immunoblots of E-cadherin, ZO-1 and β -Actin and from NCI-N87 cultures seeded at 2.5×10^5 cells/cm ² and grown in complete RPMI-1640.....	264
A. 2	NCI-N87 cellular viability after 5 and 20 h in RPMI-1640 medium following the 3 h treatment with the different apical pH and controls.....	266

A. 3	Caco-2 cellular viability after 5 and 20 h in DMEM medium following the 3 h treatment with the different apical pH and controls.	266
A. 4	Effect of the apical pH on the TEER of NCI-N87 monolayers.....	267
A. 5	X-ray diffractograms of native starch (Hylon VII) and carboxymethyl starch powder (CMS-P).....	269
A. 6	X-ray diffractograms of carboxymethyl starch microspheres	270
A. 7	DSC thermograms of native starch (Hylon VII) and carboxymethyl starch powder	271
A. 8	DSC thermograms of carboxymethyl starch microspheres.....	272
A. 9	X-ray diffractograms of furosemide, HAS-0 and dry mixtures of furosemide and HAS-0 at various proportions.....	273

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Caractéristiques physiologiques des organes de digestion et d'absorption du TGI chez l'humain adulte.....	14
1.2	Lignées cellulaires modèles de la barrière épithéliale intestinale utilisées pour évaluer la perméabilité des PA	39
2.1	Mécanismes (types de transport) associés à la valeur de l'exposant de libération n du modèle de Ritger et Peppas (1987) pour une forme cylindrique.....	48
2.2	Avantages économiques et de productivité avec l'utilisation des excipients multifonctionnels.	58
2.3	Caractéristiques d'un excipient idéal	59
4.1	Optimisation de la synthèse des CMA à partir de Hylon VII par réaction diphasique en milieu organique.....	100
4.2	Paramètres de production standard et variées lors de l'optimisation de la production des MS-CMA par émulsion-réticulation	102
5.1	Particle size and size distribution, bulk and tapped densities, Carr's index and Hausner ratio of carboxymethyl high amylose starch obtained by solvent precipitation, spray drying or lyophilisation (Ly) at various degrees of substitution	123
5.2	Thermogravimetric data of carboxymethyl high amylose starch obtained by solvent precipitation, spray drying or lyophilisation (Ly) at various degrees of substitution	128
6.1	Particle size and size distribution, bulk and tapped densities, Carr's index and Hausner ratio of CMHAS(Na) and CMHAS(H) particles	151
8.1	Mean diameter, cumulative size distribution and sphericity of placebo and furosemide loaded CMS microspheres at various degrees of substitution	207

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES et ACRONYMES

ACh	Acétylcholine
ADP	Adénosine diphosphate
AMCA	Acide monochloroacétique
ANOVA	Analyse de la variance, <i>Analysis of variance</i>
AP, A _p	Apical
A _p -B _l	Direction apicale à basolatérale, <i>Apical-to-basolateral direction</i>
ARA	Amidon riche en amylose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCS	Système de classification biopharmaceutique, <i>Biopharmaceutics Classification System</i>
Bl, B _l	Basolateral
B _l -A _p	Direction basolatérale à apicale, <i>basolateral-to-apical direction</i>
CD	Cytochalasin D
CDB	Calorimétrie différentielle à balayage
CEM	Concentration effective minimale
CFI	Fondation Canadienne pour l'Innovation, <i>Canada Foundation for Innovation</i>
CI	Index de Carr, <i>Carr's index</i>
CLHAS	Amidon riche en amylose réticulé, <i>Cross-linked high amylose starch</i>
CM	Groupe carboxyméthyl, <i>Carboxymethyl group</i>
CMA	Carboxyméthyl amidon
CMA(H)	Carboxyméthyl amidon forme acide
CMA(Na)	Carboxyméthyl amidon forme sodique
CMARA	Carboxyméthyl amidon riche en amylose
CMARA(H)	Carboxyméthyl amidon riche en amylose forme protonée
CMARA(Na)	Carboxyméthyl amidon riche en amylose forme sodique
C _{max}	Concentration plasmatique maximale
CMHAS	Carboxyméthyl amidon riche en amylose, <i>Carboxymethyl high amylose starch</i>
CMHAS(H)	Carboxyméthyl amidon riche en amylose forme protonée, <i>Carboxymethyl high amylose starch protonated form</i>

CMHAS(Na)	Carboxyméthyl amidon riche en amylose forme sodique, <i>Sodium carboxymethyl high amylose starch</i>
CMS	Carboxyméthyl amidon, <i>Carboxymethyl starch</i>
CMS-MS	Microsphère de carboxyméthyl amidon, <i>Carboxymethyl starch microsphere</i>
CMS-P	Carboxyméthyl amidon sous forme de poudre, <i>Carboxymethyl starch powder</i>
CTM	Concentration toxique minimale
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMEM/F12	<i>DMEM: nutrient mixture F-12</i>
DMSO	Diméthyl sulfoxyde, <i>Dimethyl sulfoxide</i>
DS	Degré de substitution, <i>Degree of substitution</i>
DS _t	Degré de substitution théorique, <i>Theoretical degree of substitution</i>
DSC	Calorimétrie différentiel à balayage, <i>Differential scanning calorimetry</i>
DTA	Analyse thermal différentiel, <i>Differential thermal analysis</i>
DTG	Thermogravimétrie différentiel, <i>Differential thermogravimetry</i>
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique, <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
E	Énergies d'activation
ER	Efficacité de réaction de carboxyméthylation
E. Coli	<i>Escherichia Coli</i>
FBS	Sérum fœtal bovin, <i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food & drug administration</i>
FGS	Fluide gastrique simulé
FIS	Fluide intestinal simulé sans pancréatine
FIS _{Pan}	Fluide intestinal simulé avec pancréatine
FQRNT	Fond de recherche du Québec – nature et technologies, <i>Quebec Nature and Technology Research Fund</i>
FU	Furosémide, <i>Furosemide</i>
FU-CMS-MS	Microspheres de carboxyméthyl amidon chargé avec de la furosemide, <i>Furosemide loaded carboxymethyl starch micropsheres</i>
GIT	Tractus gastrointestinal, <i>Gastrointestinal tract</i>
GU	Glucopyranose, <i>Glucopyranose unit</i>
Glucose-6-P	Glucose-6-phosphate
HAS	Amidon riche en amylose, <i>High amylose starch</i>
HAS-0	Amidon riche en amylose non substitué, <i>Non substituted high amylose starch</i>

HAS-0-MS	Microsphère d'amidon riche en amylose non substitué, <i>Non substituted high amylose starch microspheres</i>
HAS _{IPA}	Amidon riche en amylose traité seulement avec de l'alcool isopropylique, <i>High amylose starch treated with IPA only</i>
HAS _{NaOH}	<i>High amylose starch treated with NaOH</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCl	Acide chlorhydrique, <i>Hydrochloric acid</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HR	<i>Ratio de Hausner, Hausner ratio</i>
IgG	<i>Immunoglobulin G</i>
IPA	2-propanol, <i>Isopropyl alcohol</i>
JAM	Molécule d'adhésion jonctionnelle
Ly	Lyophilisation, <i>Lyophilisation</i>
LY	<i>Lucifer Yellow</i>
MCA	Acide monochlorocétique, <i>Monochloroacetic acid</i>
MCANa	Monochloroacétate de sodium
MEB	Microscopie électronique à balayage
MES	2(N-morpholino)ethane sulfonic acid
MS-CMA	Microsphères de carboxyméthyl amidon
Muc-6	Mucine 6
NaMCA	Monochloroacétate de sodium, <i>Sodium monochloroacetate</i>
NSERC	Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, <i>Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada</i>
P	Puissance d'agitation, <i>stirring power</i>
PA	Principe actif
P _{app}	Coefficient de perméabilité apparente, <i>Apparent permeability coefficient</i>
PBS	Tampon phosphate salin, <i>Phosphate buffered saline</i>
PEG	Polyéthylène glycol
PEN	Pénicilline, <i>Penicillin</i>
PET	Polyéthylène téréphtalate, <i>Polyethylene terephthalate</i>
P-gp	P-glycoprotéine
pKa	Constante de dissociation des acides, <i>Acid dissociation constant</i>
PL	Placebo
PL-CMS-MS	Microsphères de carboxyméthyl amidon placebo,

	<i>Placebo carboxymethyl starch microspheres</i>
PPI	Anion pyrophosphate
PRM	Protéine associée à la multirésistance aux médicaments
PS	Précipitation par solvant
RE	Efficacité de réaction, <i>Reaction efficiency</i>
RETE	Résistance électrique transépithéliale
rpm	Révolution par minute, <i>Revolution per minute</i>
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute medium 1640</i>
RT	Température de la pièce, <i>Room temperature</i>
SA	Séchage par atomisation
SD	Séchage par atomisation, <i>Spray drying</i>
SD	Écart type, <i>Standard deviation</i>
SDS	Dodécylsulfate de sodium, <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	Microscopie électronique à balayage, <i>Scanning electron microscopy</i>
SGF	Fluide gastrique simulé, <i>Simulated gastric fluid</i>
SIF	Fluide intestinal simulé, <i>Simulated intestinal fluid</i>
SMCA	Monochloroacétate de sodium, <i>Sodium monochloroacetate</i>
SP	Précipitation par solvant, <i>Solvent precipitation</i>
Span 80	Monooléate de sorbitane polyoxyéthylène, <i>Sorbitan monooleate</i>
SSG	Glycolate d'amidon sodique, <i>sodium starch glycolate</i>
STMP	Trimétaphosphate de sodium, <i>Sodium trimetaphosphate</i>
STREP	Streptomycine, <i>Streptomycin</i>
TEER	Résistance électrique transépithéliale, <i>Transepithelial electrical resistance</i>
TG	Thermogravimétrie, <i>Thermogravimetric</i>
TGA	Analyse thermogravimétrique, <i>Thermogravimetric analysis</i>
TGI	Tractus gastro-intestinal
T _{max}	Temps nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale
UDP	Uracile diphosphate
UQAM	Université du Québec à Montréal, <i>University of Quebec at Montreal</i>
USP	Pharmacopée Américaine, <i>United States pharmacopeia</i>
XRPD	Diffraction de rayons X sur poudres
ZO-1	Zonula occludens-1

LISTE DES SYMBOLES

\square	Concentration (g/ml)
Ω	Résistance électrique, <i>electrical resistance</i> (ohm)
λ	Longueur d'ondes Co-K α , <i>Co-Kα wavelength</i> (Å)
ω	Vitesse de rotation, <i>Rotational speed</i> (rpm)
φ	Propriétés et influence des excipients
ρ	Densité, <i>Density</i> (g/cm ³)
ρ_B	Densité apparente, <i>Bulk density</i> (g/cm ³)
ρ_T	Densité après tassement, <i>Tapped density</i> (g/cm ³)
σ	Écart type, <i>standard deviation</i> (multiple)
σ^2	Variance, <i>variance</i> (multiple)
Ψ	Facteur de sphéricité, <i>Sphericity factor</i>
τ	Efficacité thérapeutique
a	Nombre de principes actifs
A	Aire des monocouches, <i>Surface area of the monolayer</i> (cm ²)
C_0	Concentration initiale dans le compartiment donneur, <i>Initial concentration in the donor compartment</i> (mM)
CH_2COONa	Groupe carboxyméthyl sodique, <i>Carboxymethyl sodium group</i>
Cl^-	Ion chlorure
$-\text{COO}^-$	Groupe carboxylate, <i>Carboxylate group</i>
$-\text{COOH}$	Groupe carboxylique, <i>Carboxylic group</i>
C_{HCl}	Concentration d'acide chloridrique, <i>Hydrochloric acid concentration</i> (M)
\overline{D}	Diamètre moyen des particules, <i>Particles mean size</i> (μm)
$D_{4,3}$	Diamètre moyen normalisé par le volume (μm), <i>Volume weighted mean diameter</i> (μm)
D_{10}	Diamètre moyen de particule pour laquelle 10% de l'échantillon se trouve en dessous, <i>Mean diameter of Cumulative 10 % mass undersize</i> (μm)
D_{50}	Diamètre moyen de particule pour laquelle 50% de l'échantillon se trouve en dessous, <i>Mean diameter of Cumulative 50 % mass undersize</i> (μm)
D_{90}	Diamètre moyen de particule pour laquelle 90% de l'échantillon se trouve en dessous, <i>Mean diameter of Cumulative 90 % mass undersize</i> (μm)
dQ/dt	Flux de PA en régime permanent (μmol/s), <i>Steady-state rate of appearance of drugs in receiver</i> (μmol/s)
e	Nombre d'excipients

I	Molécule ionisée
H ⁺	Proton
HCO ₃ ⁻	Bicarbonate
k	Constante cinétique du modèle de Ritger et Peppas (t ⁻ⁿ) <i>Kinetic constant of Ritger and Peppas model (t⁻ⁿ)</i>
k ₁	Constante cinétique du modèle de Peppas and Sahlin, <i>Kinetic constant of Peppas and Sahlin model (t^{-m})</i>
K ₂	Constante cinétique du modèle de Peppas and Sahlin, <i>Kinetic constant of Peppas and Sahlin model (t^{-2m})</i>
m	Nombre de répétition, <i>Number of replicate</i>
m	Exposant de libération purement Fickienne <i>Purely Fickian release exponent</i>
m _{dry}	Masse de l'échantillon séché, <i>Mass of the dry sample (g)</i>
M _i /M _∞	Fraction de PA libéré, <i>Fraction of drug release</i>
M _{ARA,sec}	Masse d'amidon riche en amylose (Hylon VII) sec (g)
M _{CMA}	Masse de CMA (g)
M _{MCANa}	Masse de monochloracetate de sodium (g)
M _{NaOH}	Masse de NaOH (g)
M _{STMP}	Masse de STMP (g)
n	Nombre d'échantillons ou d'expériences, <i>Number of sample or experiments</i>
n	Exposant de libération du modèle de Ritger et Peppas <i>Release exponent of Ritger and Peppas model</i>
N	Vitesse de rotation, <i>Rotational speed (rpm)</i>
NI	Molécule non ionisée
n _{COOH}	Quantité molaire de groupe carboxylique, <i>Amount of carboxylic group (mol)</i>
n _{GU}	Quantité molaire de glucopyranose, <i>Amount of glucopyranose unit (mol)</i>
n _{LR}	Quantité de réactif limitant, <i>Amount of limiting reactant (mol)</i>
n _{UG}	Quantité molaire d'unité de glucose (mol)
n _{RL}	Quantité molaire de réactif limitant (mol)
-OH	Groupe hydroxyle, <i>Hydroxyl group</i>
p	Nombre d'étapes des procédés de production
P	Puissanced' agitation, <i>Agitational power (W)</i>
P _{app}	Coefficient de perméabilité apparente, <i>Apparent permeability coefficient (cm/s)</i>
St-OH	Groupe hydroxyle sur l'amidon, <i>Starch hydroxyl group</i>
St-ONa	Groupe sodique sur l'amidon, <i>Starch sodium salt group</i>
t	Temps, <i>Time (sec, min, h)</i>
t _{MS-CMA}	Temps de réaction des microsphères de CMA (H)
t _{NaOH}	Temps de prétraitement au NaOH (h)
T _{90%}	Temps pour la libération de 90% du PA, <i>Time for 90% of drug release (h)</i>

U	Unité, <i>unity</i>
V	Volt
V	<i>Volume of titration of the sample</i> (L)
V ₁	Volume initial d'hexane, <i>Initial volume of hexane</i> (mL)
V ₂	Volume final d'hexane, <i>Final volume of hexane</i> (mL)
V _{aq}	Volume de la phase aqueuse (mL)
V _b	Volume de HCl, <i>Volume of HCl</i> (L)
V _{org}	Volume de phase organique (mL)
w	Poids, <i>Weight</i> (g)
W	Masse de microsphères, <i>Weighed microspheres</i> (g)
W _{Dry}	Masse sèche, <i>Constant dry weight mass</i> (g)
W _{sw}	Masse des microspheres gonflées, <i>Weight of swollen micropsheres</i> (g)
Y	<i>Reaction yield</i> (%)

RÉSUMÉ

Un biopolymère anionique de semi-synthèse, le carboxyméthyl amidon (CMA) sous forme réticulée ou non, a récemment été introduit par le groupe de recherche sur les biomatériaux du Pr Mateescu de l'Université du Québec à Montréal (UQAM) pour l'élaboration de comprimés monolithiques à administration orale. Toutefois, la caractérisation des propriétés des CMA et de celles des formulations à base de CMA était limitée à des valeurs de degré de substitution (DS) inférieures à 0,3, à l'élaboration d'une seule forme pharmaceutique, à la synthèse des CMA en milieu aqueux et uniquement à l'utilisation de la forme sodique des CMA. L'objectif de ce projet de recherche était de poursuivre le développement des polymères de CMA comme nouveaux excipients multifonctionnels pour des formulations pharmaceutiques solides à administration orale et à libération contrôlée.

Les influences des méthodes de séchage et de faibles DS (inférieur à 0,3) sur les propriétés à l'état solide des CMA et de libération des médicaments à partir de matrices monolithiques à base de CMA ont tout d'abord été étudiées. Par la suite, les influences de l'augmentation du DS (jusqu'à 1,74) et de la forme (sodique ou acide) sur les propriétés physico-chimiques des CMA et de libération des médicaments à partir de matrices de CMA ont été par la suite étudiées. Ces études ont révélé qu'à faibles DS (0,1-0,2), les CMA sous forme sodique peuvent être préférablement utilisés comme excipient pour les libérations soutenues sans être significativement influencés par la variation du pH des milieux de dissolution. Par contre, à DS élevés (0,9-1,2), les CMA sous forme sodique peuvent être utilisés comme excipient pour les libérations retardées, puisque les libérations étaient contrôlées dans le fluide gastrique simulé (FGS) par diffusion, sur des périodes allant jusqu'à 20 h, suivi d'une érosion rapide, abaissant à moins de 3 h la libération complète du médicament dans le FIS.

À la suite de ces études qui utilisaient les CMA comme excipient pour l'élaboration de comprimés monolithiques, il a été investigué si les CMA étaient des excipients intéressants pour l'élaboration d'un système gastro-rétentif d'administration de médicaments. Pour ce faire, l'influence du DS sur les propriétés physico-chimiques, de libération de médicaments et de mucoadhésion des microsphères de carboxyméthyl amidon (MS-CMA) ainsi que sur les interactions des MS-CMA avec des modèles des barrières épithéliales du TGI a été évaluée. Les résultats ont révélé que le taux de libération de la furosémide dans le milieu gastrique diminuait avec l'augmentation du DS, tandis que la libération dans le milieu intestinal était immédiate pour tous les DS évalués. La mucoadhésion des microsphères est favorisée par les DS élevés (0,6-1,0) sous des conditions acides. Les microsphères en contact avec des cellules NCI-N87 et Caco-2 ont augmenté la perméabilité transépithéliale de la furosémide. Ces résultats démontraient que les MS-CMA avec des DS élevés (0,6-1,0) sont appropriées comme système gastro-rétentif d'administration de médicaments.

L'utilisation de la lignée cellulaire NCI-N87 comme outil *in vitro* pour caractériser les interactions entre des formes pharmaceutiques solides et la muqueuse gastrique au pH acide de l'estomac humain constituait une première puisque la capacité de la lignée NCI-N87 à servir de modèle *in vitro* de la barrière épithéliale gastrique a été établie au cours de cette thèse. L'optimisation des conditions de culture des cellules, la détermination de la résistance des monocouches au gradient de pH apicale à basolatérale maximal et la quantification de coefficients de perméabilité (P_{app}) de trois composés montraient que la lignée cellulaire NCI-N87 peut être utilisée comme modèle *in vitro* pour évaluer la perméabilité gastrique des PA sous des conditions physiologiques se retrouvant dans l'estomac humain.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse a montré que le CMA sous forme sodique, réticulé ou non, est un excipient multifonctionnel prometteur pour l'élaboration de formes pharmaceutiques solides à administration orale et à libération contrôlée. La sélection de la valeur du DS des CMA est fonction des propriétés fonctionnelles désirées pour un PA donné tandis que les propriétés physico-chimiques des CMA peuvent être ajustées afin de faciliter leur utilisation ou la production des formulations, à la seule condition que les CMA possèdent une structure amorphe ou correspondante à un patron de type-V. Ces résultats ouvrent la voie à de nombreux axes de recherche afin de poursuivre le développement du CMA comme excipient multifonctionnel et l'établissement de la lignée cellulaire NCI-N87 comme modèle de la barrière épithéliale gastrique pour prédire l'absorption gastrique *in vivo* des PA et les propriétés des formes solides à administration orale à l'intérieur du TGI.

Mots-clés : Carboxyméthyl amidon, degré de substitution, propriétés physico-chimiques, libération contrôlée, comprimés monolithiques, microsphères mucoadhésives gastro-rétentives, excipient multifonctionnel, perméabilité gastrique des médicaments.

INTRODUCTION

LE CARBOXYMETHYL AMIDON : UN NOUVEL EXCIPIENT PHARMACEUTIQUE

La recherche de nouveaux principes actifs (PA), qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique, ainsi que la caractérisation de leurs propriétés physiques, chimiques, toxicologiques, pharmacocinétique et pharmacodynamiques a toujours été le centre d'attention prédominant de l'industrie pharmaceutique et des autorités réglementaires (Pifferi, Santoro et Pedrani, 1999). Cette recherche soutenue a mené, au cours des dernières années, à l'élaboration de PA caractérisés généralement par une augmentation croissante de leur pureté, puissance et spécificité. Ces PA nouveaux peuvent être également caractérisés par un accroissement de leur masse moléculaire, une augmentation de leur sensibilité aux systèmes enzymatiques du corps humain et par une diminution de leur solubilité, perméabilité et stabilité (Moreton, 2010b ; Yang, Chu et Fix, 2002). Ces dernières caractéristiques limitent directement la capacité d'administration de ces PA par voie orale (Asghar et Chandran, 2006 ; Basit, 2005 ; Pouton, 2006 ; Prego *et al.*, 2005). Dans le contexte où un objectif majeur de l'industrie pharmaceutique dans la découverte et l'élaboration d'un nouveau PA est qu'il soit administrable par voie orale (Florence et Hussain, 2001), la réussite ou non du développement de formulations pharmaceutiques solides à administration orale innovatrices et robustes en vertu de leurs propriétés peut être un facteur décisif définissant le succès scientifique et commercial de ces PA (Goldring, 2008 ; Muzzio, Shinbrot et Glasser, 2002).

En effet, l'optimisation des concentrations plasmatiques des PA est directement reliée aux propriétés des formulations pharmaceutiques. Cette optimisation permet d'augmenter conséquemment l'efficacité thérapeutique des PA, l'assiduité des patients au traitement et la valeur ajoutée du médicament ainsi qu'une diminution des effets secondaires (Sam et Fokkens, 1997). En partant de ces prémisses de base, l'efficacité thérapeutique (τ) d'une

formulation est transposée comme étant une sommation des propriétés et influences (φ) de chacun des constituants de la formulation (PA et excipients), des procédés de production ainsi que des interactions entre l'ensemble de ceux-ci :

$$\tau_{\text{Formulation}} = \sum_{i=1}^a \varphi_{\text{PA}}(i) + \sum_{i=1}^e \varphi_{\text{Excipients}}(i) + \sum_{i=1}^p \varphi_{\text{Procédés}}(i) + \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^e \sum_{k=1}^p \varphi_{\text{Interactions}}(i,j,k) \quad (1)$$

où a est le nombre de principes actifs, e est le nombre d'excipients et p est le nombre d'étapes des procédés de production. Dans le même ordre d'idées, la qualité ou la robustesse (absence de variabilité) d'une formulation est définie en terme de variance (σ^2) (adapté de Moreton, 2010b):

$$\sigma_{\text{Formulation}}^2 = \sum_{i=1}^a \sigma_{\text{PA}}^2(i) + \sum_{i=1}^e \sigma_{\text{Excipients}}^2(i) + \sum_{i=1}^p \sigma_{\text{Procédés}}^2(i) + \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^e \sum_{k=1}^p \sigma_{\text{Interactions}}^2(i,j,k) \quad (2)$$

Ces équations montrent que l'élaboration de formulations pharmaceutiques solides à administration orale est un processus multifactoriel pouvant être complexe, mais pour lequel les propriétés de ces formulations ainsi que leur manufacturabilité sont majoritairement définies et fortement dépendantes des excipients choisis, de leur nombre, de leur concentration et de leurs interactions à la fois avec les PA ainsi que les uns avec les autres (Rowe, Sheskey et Owen, 2006).

Au-delà des exigences intrinsèques sur les propriétés physico-chimiques des formes solides, les excipients sont maintenant requis pour réaliser des fonctions technologiques importantes et spécifiques affectant l'activité thérapeutique des PA telle que contrôler leur libération dans le temps et l'espace ou de promouvoir leur absorption au travers des muqueuses du tractus gastro-intestinal (TGI) (Allen *et al.*, 1997 ; Pifferi, Santoro et Pedrani, 1999 ; US Department of Health and Human Services, 2005). Spécifiquement pour ce premier cas, les excipients doivent non seulement contrôler des taux de libération optimaux des PA au moyen de divers mécanismes, mais aussi les protéger, contrôler leur lieu de libération ainsi que maximiser leur

temps de résidence à leur site d'absorption maximale dans le TGI (Chien, 1992 ; Choudhury et Kar, 2009 ; Talukder et Fassihi, 2004). Ainsi, le concept traditionnel définissant un excipient comme une substance support autre que les PA a subi une évolution considérable reflétant plus adéquatement ses rôles actuels. En effet, ils sont passés de simple véhicule physiquement, chimiquement et pharmacologiquement inerte à agent fonctionnel essentiel d'une formulation pharmaceutique moderne (Pifferi, Santoro et Pedrani, 1999 ; Rowe, Sheskey et Owen, 2006 ; Te Wierik *et al.*, 1997).

Bien qu'il existe plus de 1500 excipients selon les estimations actuelles, il existe encore de nombreuses lacunes dans la gamme des excipients disponibles (Moreton, 2010b). De plus, selon Goldring (2008), les nouveaux excipients représentent une source d'innovation incontournable pour l'industrie pharmaceutique. Ceci démontre que l'industrie pharmaceutique a besoin et est constamment à la recherche de nouveaux excipients pour permettre l'élaboration de formulations pharmaceutiques solides à administration orale pour les nouveaux PA. Il est même possible d'ajouter que l'industrie pharmaceutique possède un intérêt de premier plan pour le développement d'excipients multifonctionnels. En effet, l'ajout de plusieurs excipients à une formulation afin d'obtenir la meilleure efficacité thérapeutique (voir équation 1), multiplie les possibilités d'interactions entre les excipients et les PA (équation 2). Cette augmentation du nombre d'excipient peut augmenter significativement les risques potentiels d'incompatibilité entre ceux-ci et les PA et ainsi, compromettre la stabilité à long terme et l'innocuité des formulations (Korhonen *et al.*, 2000).

Depuis quelques années, les avancements des sciences des matériaux ainsi que l'augmentation de la disponibilité de méthodes de caractérisation des solides de plus en plus sophistiquées permettent la conception et le développement de nouveaux excipients pouvant posséder des caractéristiques sur mesure pour une formulation particulière ou pour un procédé de production particulier (Pifferi, Santoro et Pedrani, 1999). En ce sens, le développement de nouveaux excipients à partir de ceux traditionnellement utilisés dans l'industrie pharmaceutique, pour lesquels leurs propriétés peuvent être modifiées physiquement, chimiquement ou enzymatiquement possède de nombreux avantages du point

de vue des économies d'échelle et d'efficacité de développement. Les dérivés d'amidon produits à partir de différentes sources d'amidon sont d'excellents exemples de nouveaux excipients élaborés au moyen de cette stratégie. De plus, ils sont synthétisés à partir de sources renouvelables disponibles en grande quantité, biocompatibles et biodégradables, particulièrement lorsqu'administrés oralement (Calinescu *et al.*, 2007 ; Marques, Reis et Hunt, 2002). Les amidons sont utilisés comme excipients pharmaceutiques assurant des fonctions de désintégrant, de liant et de matériau de remplissage depuis de nombreuses décennies (Bos *et al.*, 1987 ; Daniel *et al.*, 2007 ; Rowe, Sheskey et Owen, 2006).

Parmi ces dérivés d'amidon, un biopolymère anionique de semi-synthèse, le carboxyméthyl amidon (CMA) sous forme réticulée ou non, a récemment été introduit par le groupe de recherche sur les biomatériaux du Pr Mateescu de l'Université du Québec à Montréal (UQAM) comme nouvel excipient pharmaceutique pour la production de comprimés monolithiques à administration orale (Mulhbachet *et al.*, 2001 ; Mulhbachet, Mateescu et Calinescu, 2005, 2008). Le concept motivant la carboxyméthylation des amidons est de convertir les amidons natifs en excipients hydrophiles ioniques modulant le taux de libération des médicaments en fonction de la variation des valeurs du pH physiologique au long du TGI. Spécifiquement, le taux de libération des PA à partir des matrices de CMA devrait être dans un milieu acide (milieu gastrique) plus faible que dans un milieu neutre (milieu intestinal). Les études initiales utilisant du CMA en tant qu'agent fonctionnel à l'intérieur de formulations pharmaceutiques (Calinescu *et al.*, 2005 ; Calinescu *et al.*, 2007 ; Ispas-Szabo *et al.*, 2007 ; Mulhbachet *et al.*, 2001 ; Mulhbachet, Ispas-Szabo et Mateescu, 2004 ; Mulhbachet et Mateescu, 2005) ont démontré le potentiel certain du CMA étant donné que celui-ci était un excipient permettant de contrôler la libération d'une variété de PA (petites molécules et agents bioactifs) sur des périodes pouvant être supérieures à 24 h.

Toutefois, afin d'assurer l'obtention de formulations élaborées à partir des nouveaux excipients robustes et stables garantissant l'efficacité thérapeutique de ces formulations (par définition, en tout temps chez chaque sujet), la caractérisation des propriétés des excipients doit être au-delà des tests simples d'identification et de pureté tel qu'indiqué généralement à l'intérieur des monographies des pharmacopées (Pifferi, Santoro et Pedrani, 1999). Le

développement de tous les excipients devrait être associé à une caractérisation complète ainsi qu'à une connaissance approfondie de leurs propriétés physiques, chimiques, structurales, fonctionnelles et toxicologiques intrinsèques ainsi que de l'influence de ces propriétés sur les propriétés subséquentes des formulations solides afin de garantir leur comportement durant les phases de développement, de production et d'administration (Moreton, 2010c ; Rowe, Sheskey et Owen, 2006). En fait, la connaissance de ces propriétés fait partie des conditions *sine qua non* pour faciliter l'acceptation de l'utilisation chez l'humain des nouveaux excipients par les autorités réglementaires des médicaments (US Department of Health and Human Services, 2005).

Objectif général

Dans le contexte actuel décrivant les rôles et l'importance des nouveaux excipients pour assurer l'efficacité thérapeutique des nouveaux PA, l'objectif général de ce projet de recherche consiste à poursuivre le développement des polymères de CMA comme nouvel excipient multifonctionnel pour des formulations pharmaceutiques solides à administration orale et à libération contrôlée. Ce développement des CMA est effectué par la caractérisation systématique de l'ensemble de ses propriétés intrinsèques, de leurs influences subséquentes et des propriétés des formulations les contenant. La caractérisation non équivoque des influences des propriétés des CMA sur les propriétés des formulations requière que les formulations développées au cours de ce projet le soient à partir de CMA exclusivement. Il en est de même pour la démonstration du caractère multifonctionnel des CMA.

Contenu de la thèse

La présente thèse se divise en deux parties. La première partie présente l'état des connaissances actuelles sur les formulations pharmaceutiques à administration orale. Tout d'abord, cette revue couvre les principes régissant l'administration orale des médicaments et de leur absorption dans le TGI (chapitre I). Par la suite, un recensement des travaux traitant des systèmes d'administration solide des médicaments par voie orale et à libération contrôlée (chapitre II) est présenté. Nous terminerons cette partie avec une synthèse des travaux de la

littérature portant sur les amidons, les dérivés d'amidon et spécifiquement sur les CMA (chapitre III).

La deuxième partie, présente les contributions expérimentales de l'auteur de cette thèse. En premier lieu, le chapitre IV est consacré à la présentation du projet de recherche par la définition des problématiques, des hypothèses et des objectifs spécifiques de recherche. Une synthèse des contributions principales à la recherche réalisées au cours de cette thèse ainsi que les approches méthodologiques développées pour répondre aux objectifs de cette recherche sont également présentées dans ce chapitre.

Le chapitre V présente, analyse et discute les principaux résultats obtenus sur l'étude de l'influence des méthodes de séchage et de faibles degrés de carboxyméthylation sur la structure et les propriétés de libération du CMA, au moyen d'un article publié dans la revue *AAPS PharmSciTech*.

Le chapitre VI présente les principaux résultats obtenus sur l'utilisation du CMA comme excipient pour la libération contrôlée de médicaments, au moyen d'un article publié dans la revue *International Journal of Pharmaceutics*. Plus précisément, ce chapitre présente, analyse et discute l'influence de l'augmentation du degré de carboxyméthylation sur les propriétés des CMA et des mécanismes de libération de médicaments à partir de comprimés monolithiques.

Le chapitre VII présente une étude sur l'utilisation de la lignée cellulaire NCI-N87 comme modèle de la barrière épithéliale gastrique pour l'étude de la perméabilité des médicaments, au moyen d'un article publié dans la revue *Biochemical and Biophysical Research Communications*. La présentation, l'analyse et la discussion des résultats obtenus sur l'optimisation des conditions de culture et sur la caractérisation de la lignée NCI-N87 cultivée en monocouche sur des filtres est un préambule au chapitre suivant, où ce modèle de barrière épithéliale gastrique est utilisé pour caractériser une formulation de microsphères à base de CMA.

Le chapitre VIII présente les principaux résultats obtenus sur le développement d'un système gastro-rétentif d'administration de médicaments avec des microsphères de carboxyméthyl amidon (MS-CMA) à partir d'un manuscrit soumis pour publication dans la revue *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Spécifiquement, ce chapitre présente, analyse et discute l'influence du degré de carboxyméthylation sur les propriétés physico-chimiques des MS-CMA, de leurs propriétés de libération de médicaments, de leurs interactions avec des barrières modèles du TGI (NCI-N87 et Caco-2) et finalement de leurs propriétés de mucoadhésion.

Le chapitre IX discute de l'ensemble des résultats obtenus ainsi que des méthodes utilisées pour les obtenir. Le chapitre X présente les conclusions de cette recherche et propose certaines recommandations sur l'utilisation du CMA comme excipient pour des formulations pharmaceutiques solides à administration orale ainsi que l'utilisation de la lignée cellulaire NCI-N87 comme modèle de la barrière épithéliale gastrique. Certaines perspectives de recherche sur le CMA sont également présentées.

L'annexe A présente des résultats supplémentaires sur la lignée cellulaire NCI-N87 et sur les MS-CMA. Ces résultats permettent une analyse et une discussion plus approfondie des résultats obtenus et présentés dans les chapitres V à VIII.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTAT DES CONNAISSANCES

CHAPITRE I

L'ADMINISTRATION DES MÉDICAMENTS PAR VOIE ORALE

L'objectif sous-jacent à l'action de prendre un médicament est de livrer à une cible pharmacologique une dose adéquate de principe actif (PA) afin que celui-ci procure une action thérapeutique pour prévenir, guérir ou contrôler divers états pathologiques. Cet objectif peut, à première vue, sembler simple et évident puisque le fait de s'administrer ou se faire administrer un médicament est un acte commun, voire anodin, effectué par des milliers de personnes chaque jour. Toutefois, l'élément clé de cet objectif, « la livraison d'une dose adéquate de PA à une cible pharmacologique », qui inclut la stabilité du PA dans les fluides physiologiques jusqu'à l'atteinte de sa cible et de l'obtention d'un profil pharmacocinétique spécifique, demeure le principal défi de tout développement de formes pharmaceutiques (médicaments) (Uchizono, 2010). L'atteinte de cet objectif est invariablement le résultat d'une recherche scientifique multidisciplinaire exhaustive qui a pour but de caractériser et de mieux comprendre les propriétés physico-chimiques et biopharmaceutiques intrinsèques des PA ainsi que celles des formulations pharmaceutiques en fonction de leur voie d'administration. Dans ce cadre, le propos de ce premier chapitre est de présenter certains concepts fondamentaux reliés à l'administration des médicaments, plus particulièrement, à l'administration des petites molécules actives par voie orale relativement au développement des formes pharmaceutiques solides.

1.1 Importance de l'administration des médicaments par voie orale

L'administration des médicaments peut s'effectuer au moyen de plusieurs de voies. Comme la voie orale (per os, gastro-intestinale), les voies parentérales (injection), la voie topique et la voie oculaire. Parmi les moins fréquentes, se trouve la voie intracaudale et la voie intrasynoviale. En fait, les agences réglementaires des médicaments canadiennes (Santé Canada) et américaines (« *Food and Drug Administration* », FDA) définissent plus de 105 différentes voies d'administration des médicaments en fonction dont ceux-ci sont introduits dans le corps ou de leur mode d'action (local ou systémique) (Santé Canada, 2011 ; US Department of Health and Human Services, 1992). De ces différentes voies, la voie orale est, sans contredit, la voie d'administration des médicaments préférée et privilégiée à la fois par les patients et par l'industrie pharmaceutique. L'importance de la voie orale s'atteste par le remarquable fait que la proportion de formes pharmaceutiques administrées par cette voie est actuellement estimée à 90 % (Kokate *et al.*, 2010) où les formes pharmaceutiques solides (capsules, comprimés, granulés) occupent un peu plus de 80% de cette proportion (Jivraj, Martini et Thomson, 2000). La prééminence des formes pharmaceutiques administrées par voie orale s'explique par leur nature non invasive, leur facilité d'administration ainsi que leur production plus simple et à moindre coût en comparaison avec des formes pharmaceutiques administrées au moyen de plusieurs autres voies (Kokate *et al.*, 2010 ; Zanolwiak, 2000). De plus, les formes pharmaceutiques solides sont en générales physiquement et chimiquement plus stables offrant une durée de vie prolongée aux médicaments (Jivraj, Martini et Thomson, 2000). Ces avantages favorisent l'assiduité des patients au traitement et sont beaucoup plus avantageux économiquement pour l'industrie pharmaceutique. Afin de chiffrer l'importance économique des formes pharmaceutiques orales, citons que, parmi les cinq médicaments les plus vendus mondialement, quatre étaient des formes pharmaceutiques solides administrées oralement dont la valeur totale des ventes s'élevait à plus de 36.6 milliards \$ US (IMS Health, 2010). Ces raisons expliquent pourquoi il a été précédemment cité que l'administration par voie orale d'un nouveau PA est un objectif important pour l'industrie pharmaceutique.

1.2 Tractus gastro-intestinal

Le TGI est un des constituants du système digestif (figure 1.1) et a pour fonctions de digérer les aliments (avec la participation des organes digestifs annexes) pour ensuite absorber sélectivement les nutriments tout en entravant l'entrée de pathogènes, de toxines et de macromolécules non digérées (Daugherty et Mrsny, 1999b). Ces fonctions sont difficilement séparables de celles de l'administration des médicaments. En effet, par le passage des formes pharmaceutiques au long du TGI, la voie orale utilise la fonction d'absorption des nutriments du TGI pour assurer la livraison des PA aux cibles pharmacologiques. De façon simplifiée, à la suite de l'ingestion d'une forme pharmaceutique solide, le PA doit être libéré de la forme solide au moyen de divers mécanismes afin de se retrouver solubilisé dans la lumière du TGI et être finalement absorbé de la lumière du TGI à une région spécifique du TGI ou aux systèmes circulatoire et lymphatique afin de pouvoir effectuer son action thérapeutique, respectivement, locale ou systémique (figure 1.2). Toutefois, les fonctions de protection et de digestion du TGI influencent directement l'absorption des PA et par conséquent, le développement des formes pharmaceutiques solides. Les sections suivantes présentent ces propriétés relativement à l'anatomie, la physiologie et les structures générales du TGI ainsi que spécifiquement pour certains organes du TGI. La description détaillée de l'absorption des PA et celle de la libération des PA à l'intérieur du TGI seront présentées respectivement dans les sections 1.3 et 2.2.1.

1.2.1 Anatomie, physiologie et microstructures générales

Le TGI est un conduit formé d'un ensemble d'organes relié en continu de la bouche à l'anus qui parcourt la cavité ventrale du corps (figure 1.1). Ces organes peuvent être classifiés selon leur fonction principale dans le système digestif soit : de voie de passage (la bouche, le pharynx, l'œsophage et le rectum) ou d'organe de digestion et d'absorption (l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin à l'exception de la portion distale) (Kokate *et al.*, 2010). Il est à noter que cette classification sommaire permet également, dans le cadre de cette thèse, de circonscrire l'administration des PA par voie orale aux organes spécifiés dans la catégorie d'organe de digestion et d'absorption. Le tableau 1.1 montre que chacun de ces organes possède des caractéristiques physiologiques très différentes les unes des autres.

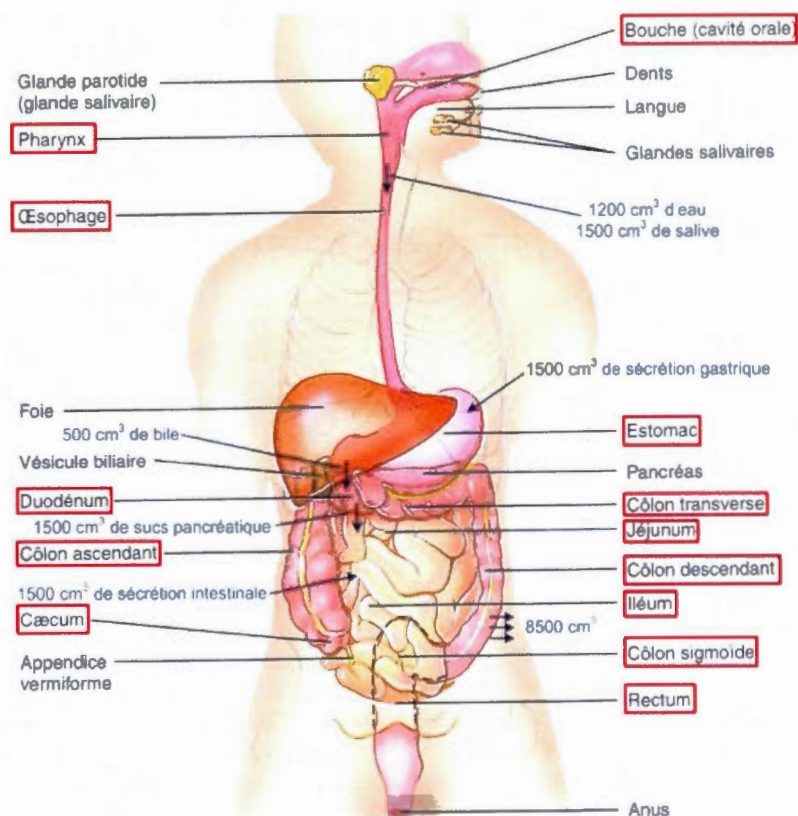


Figure 1.1 Anatomie et caractéristiques du système digestif. Organes du TGI encadrés en rouge (adapté de Florence et Attwood, 2006 ; Tortora et Grabowski, 2000).

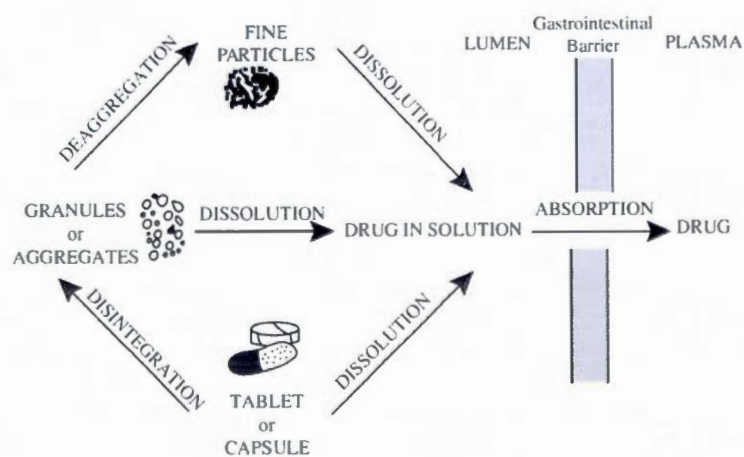


Figure 1.2 Résumé des processus impliqués suite à l'administration orale d'un médicament sous forme solide (adapté de Blanchard, 1978).

Avant de décrire les propriétés propres des organes de digestion et d'absorption, il est utile de présenter les microstructures qui assurent des fonctions semblables dans ces organes. La lumière de l'estomac, de l'intestin grêle et du gros intestin est tapissée d'une muqueuse qui est formée de trois couches : (1) un épithélium de revêtement, (2) une lamina propria et (3) une muscularis mucosæ, de la lumière du TGI vers l'extérieur (figure 1.3). La muscularis mucosæ est une couche mince de fibres musculaires lisses qui fronce la surface de la muqueuse et qui produit les mouvements locaux de la muqueuse, permettant ainsi d'accroître considérablement la surface de la muqueuse (tableau 1.1) tout en l'exposant au contenu du TGI (Marieb, 1999 ; Tortora et Grabowski, 2000). La lamina propria est formée de tissu conjonctif lâche parcouru de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques qui permettent de distribuer aux autres tissus du corps les nutriments et les PA absorbés au travers de l'épithélium (Standring, 2009 ; Tortora et Grabowski, 2000). L'épithélium de revêtement est une couche protectrice du type épithélium simple prismatique non cilié qui, par sa fonction de barrière physiologique à la surface des organes du TGI, a une importance majeure dans l'administration des médicaments par voie orale.

Les épithéliums sont formés d'une variété de types de cellules épithéliales qui possèdent différentes fonctions spécifiques selon l'organe du TGI qu'elles protègent. Les cellules caliciformes, qui se retrouvent dans tous les épithéliums, ont pour fonction de sécréter du mucus à la surface de l'épithélium (figure 1.4a). Ce mucus adhérent et lubrifiant assure l'hydratation de l'épithélium, empêche la digestion des organes du TGI et facilite le mouvement des solides dans le TGI. Le mucus sécrété par les cellules caliciformes, indépendamment des organes par lesquels il est sécrété, est composé principalement d'eau (> 95%), de mucines qui sont des glycoprotéines de hauts poids moléculaires (2 à 14×10^6 g/mol) et, dans une plus faible proportion (< 1%), d'enzymes, de lipides, de protéines, de sels et de mucopolysaccharides (Andrews, Laverty et Jones, 2009 ; Calcagno et Siahaan, 2005). La composition exacte du mucus varie également selon le site de sécrétion, son rôle physiologique et mécanique ainsi que la présence ou non de pathologie (Khanvilkar, Donovan et Flanagan, 2001). Les propriétés rhéologiques et adhésives du mucus dépendent des interactions entre les mucines hydratées qui s'organisent en un réseau structuré par l'enchevêtrement physique de leurs chaînes et la formation de liaisons non covalentes entre

leurs chaînes (Andrews, Laverty et Jones, 2009 ; Khanvilkar, Donovan et Flanagan, 2001). La présence de cette couche de mucus à la surface des épithéliums offre donc une première barrière physique entre le contenu de la lumière et les organes du TGI.

Tableau 1.1 Caractéristiques physiologiques des organes de digestion et d'absorption du TGI chez l'humain adulte (adapté de Daugherty et Mrsny, 1999b ; Kararli, 1995 ; Kokate *et al.*, 2010 ; Macheras, Reppas et Dressman, 1995)

Région du TGI	Longueur (cm)	Surface (m ²)	pH	Temps de résidence	Activité métabolique
Estomac		3.5			
À jeun	25	0.025-0.05 ^[1]	1.4-2.1	0.5-1.5 h	Protéases, lipase
Postprandial	variable	1.0-1.6 ^[1]	2-5	2-6 h	
Intestin grêle	370-630	74-210	4.4-7.4	6-10 h	Polysaccharides, protéases, peptidases, lipases, nucléases
Duodénum	20-30	11.3-28.3	4.9-6.4	0.25 – 0.5 h	
Jéjunum	150-260	27-75	4.4-6.4	1.5-2 h	
Iléum	200-350	36-105	6.5-7.4	5-7 h	
Gros intestin	150	15.7	5.5-7.4	< 35 h	Enzymes bactériennes
Cæcum	7	0.05	5.5-7		
Colon	90-150	15	7.4		
Rectum	11-16	0.015	7		

[1] Volume (L)

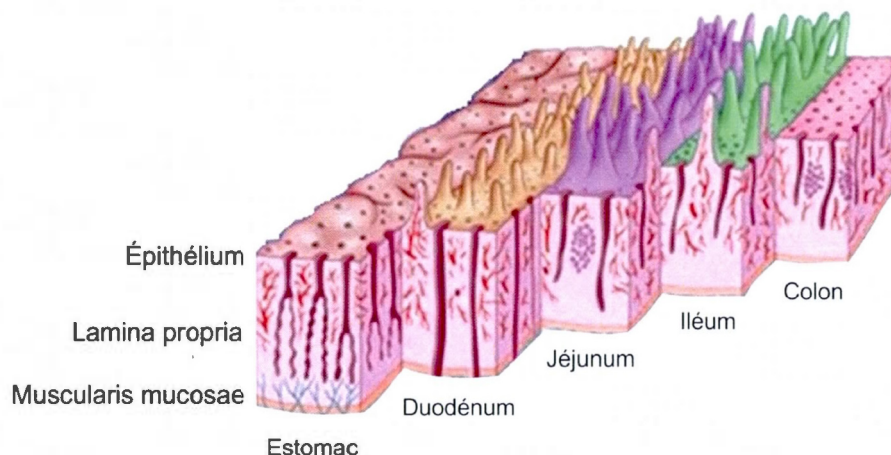


Figure 1.3 Muqueuses des organes de digestion et d'absorption du TGI humain (adapté de Standring, 2009).

La propriété de barrière sélective des épithéliums est également assurée par la présence de trois types de jonctions cellulaires entre les cellules épithéliales : (1) les jonctions serrées (*zonula occludens*), (2) les jonctions d'adhésion (*zonula adherens*) et (3) les desmosomes (*macula adherens*) (figure 1.4b). Les jonctions intercellulaires forment un chemin tortueux qui couvre la totalité de la hauteur entre deux cellules adjacentes (Calcagno et Siahaan, 2005). Les jonctions serrées ceinturent complètement chaque cellule épithéliale pour former un joint continu qui scelle la lumière du TGI de l'intérieur des organes et qui définit la frontière entre les composantes apicales et basolatérales de la membrane plasmique permettant ainsi la polarité cellulaire des cellules épithéliales (Shin, Fogg et Margolis, 2006). À la jonction serrée, les membranes plasmiques sont si étroitement rapprochées qu'il n'existe pas d'espace intercellulaire et les membranes sont jusqu'à moins de 2Å de l'une de l'autre (Washington, Washington et Wilson, 2001). Cette adhésion entre les cellules est réalisée au moyen de trois grandes familles de protéines transmembranaires, soit les occludines, les claudines et les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM) (figure 1.5). La description détaillée de ces familles de protéines, de leurs fonctions au sein des jonctions serrées ainsi que de la structure complète des jonctions serrées est disponible dans les publications de Daugherty et Mrsny (1999a) et de Shin *et al.* (2006). La protéine d'échafaudage Zonula Occludens-1 (ZO-1) stabilise les jonctions serrées en interagissant avec les occludines et les

claudines transmembranaires pour les relier aux filaments d'actines. De plus, l'intégrité des jonctions serrées est dépendante du calcium où la suppression du calcium provoque un réarrangement de la structure de l'assemblage de protéines des jonctions serrées et ainsi, l'ouverture de ces dernières (Calcagno et Siahaan, 2005). La suppression du calcium peut également perturber l'intégrité des jonctions d'adhésions.

En effet, les jonctions d'adhésion (aussi appelées ceinture de desmosomes), localisées sous les jonctions serrées à partir de la lumière du TGI, sont formées dans l'espace intercellulaire par l'association divalente des protéines transmembranaires E-cadhérines, laquelle association est calcium dépendante (figure 1.5) (Trojanovsky, Klingelhofer et Trojanovsky, 1999). Les jonctions d'adhésion ceinturent également les cellules épithéliales et sont responsables de l'adhésion entre les cellules adjacentes, *i.e.* aident les surfaces épithéliales à résister à la séparation (Tortora et Grabowski, 2000). La distance entre les membranes plasmiques à la jonction d'adhésion est beaucoup plus importante que celles des jonctions serrées, soit d'environ 20 nm (Standring, 2009). Toutefois, la formation des jonctions serrées est dépendante de la formation préalable des interactions des E-cadhérines des jonctions d'adhésion (Mitic et Anderson, 1998).

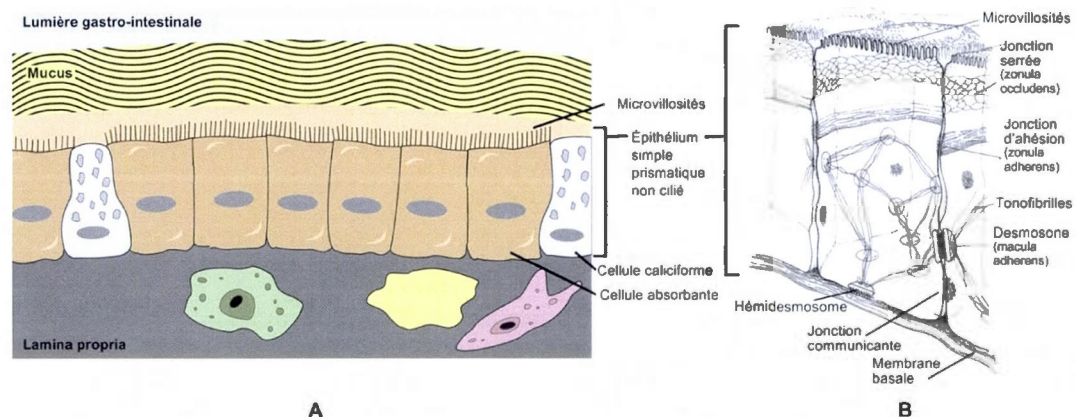


Figure 1.4 A) Organisation des barrières épithéliales du TGI (adapté de Daugherty et Mrsny, 1999b) et B) jonctions cellulaires entre les cellules épithéliales (adapté de Cormack, 2001).

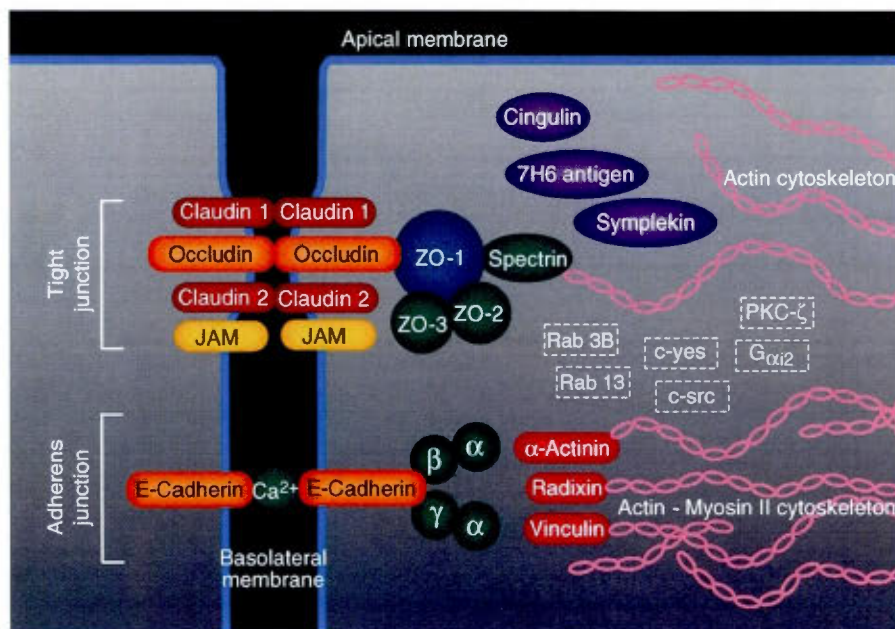


Figure 1.5 Jonctions serrées et jonctions d'adhérence entre les cellules épithéliales humaines (Daugherty et Mrsny, 1999b).

Le dernier type de jonction cellulaire, les desmosomes, sont situés près de la membrane basolatérale des cellules et bien qu'ils assurent une fonction d'adhésion entre les cellules adjacentes, ils ont moins d'importance dans la fonction de barrière de l'épithélium dû à leur présence discontinue à la périphérie des cellules et à une plus grande distance entre les membranes plasmiques à la jonction (25 nm) (Calcagno et Siahaan, 2005 ; Standring, 2009). En fait, la capacité de barrière de l'épithélium, qui peut être évaluée en terme de résistance électrique transépithéliale (RETE), est la conséquence de la présence conjointe des jonctions serrées et d'adhésion (Madara, 1998).

1.2.2 Estomac

L'estomac est un réservoir temporaire qui, par ses fonctions mécaniques (brassage), chimiques et enzymatiques, permet de transformer le bol alimentaire provenant de la bouche et de l'œsophage en chyme. À partir de la jonction gastro-œsophagienne (cardia) jusqu'au pylore, qui contrôle l'évacuation du chyme dans le duodénum, l'estomac peut être divisé en trois régions : le fundus, le corps et l'antrum pylorique dont le volume total varie grandement

selon si l'estomac est à jeun ou postprandial (tableau 1.1). La paroi de l'estomac est recouverte d'un épithélium simple prismatique entièrement composé de cellules caliciformes (cellules à mucus superficielle) et qui est parsemé de millions de profondes invaginations appelées cryptes de l'estomac qui se prolongent jusqu'aux glandes gastriques (figures 1.3 et 1.6a) (Marieb, 1999). Les glandes gastriques contiennent trois types de cellules exocrines, dont les sécrétions se déversent dans la lumière de l'estomac, et d'un type de cellules endocrines : les cellules à mucus du collet, les cellules pariétales, et les cellules principales et les cellules entéro-endocrines (figure 1.6a). La distribution des glandes gastriques et des cellules qui les composent varient selon les régions de l'estomac. En général, les glandes de la région gastro-œsophagienne produisent surtout du mucus, les glandes des régions du fondus et du corps produisent surtout des sécrétions gastriques et les glandes de l'antrum pylorique produisent surtout l'hormone de stimulation appelée gastrine (Washington, Washington et Wilson, 2001).

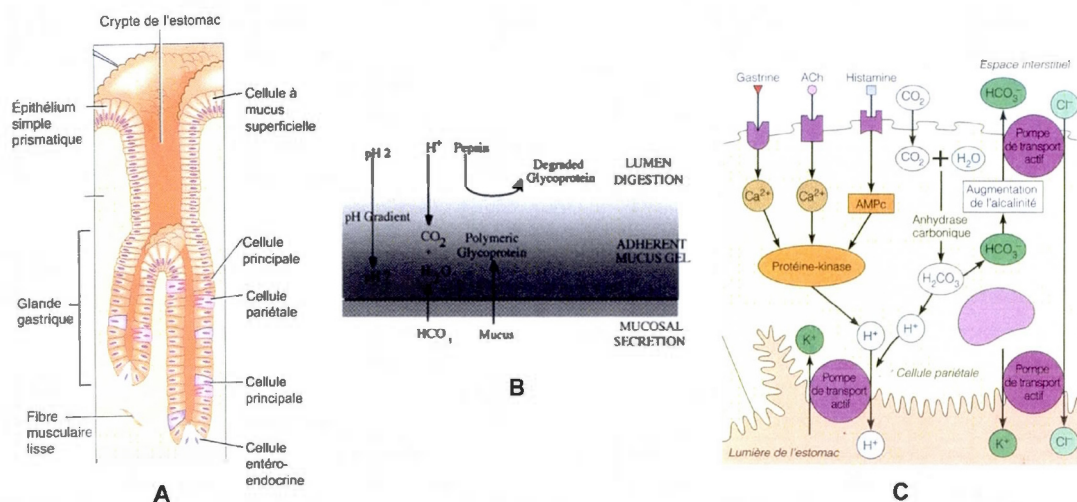


Figure 1.6 Muqueuse gastrique: A) crypte de l'estomac et glande gastrique (adapté de Tortora et Grabowski, 2000), B) mécanismes de défense du mucus gastrique (Washington, Washington et Wilson, 2001) et C) mécanisme de sécrétion du HCl par les cellules pariétales (Marieb, 1999).

Les cellules à mucus superficiel et à mucus du collet sécrètent le mucus gastrique. Le mucus gastrique est un mécanisme de défense pour prévenir l'estomac d'être digéré par les conditions fortement acides qui se retrouvent dans celui-ci (tableau 1.1) et par ses propres enzymes protéolytiques. Pour ce faire, le mucus gastrique est continu et est très épais à une valeur moyenne de 180 μm qui varie entre 50 à 450 μm (Allen *et al.*, 1993). De plus, le mucus gastrique est riche en bicarbonate (HCO_3^-) sécrété par les cellules épithéliales sous-jacentes lequel neutralise les acides et crée un gradient de pH au travers de la couche de mucus de la lumière de l'estomac à la surface apicale de l'épithélium (figure 1.6b). Finalement, puisque les glycoprotéines à la surface du mucus sont continuellement digérées, le mucus gastrique est constamment renouvelé (figure 1.6b). Il est estimé que le temps de renouvellement complet de la couche de mucus gastrique est de l'ordre de quatre à cinq heures (Washington, Washington et Wilson, 2001).

Les cellules pariétales produisent l'acide chlorhydrique (HCl) et le facteur intrinsèque (une glycoprotéine nécessaire à l'absorption de la vitamine B_{12}). Le HCl rend le contenu stomacal extrêmement acide (tableau 1.1) qui permet de tuer un grand nombre des microbes et de dénaturer partiellement les protéines contenues dans la nourriture. La sécrétion du HCl est la conséquence de nombreux stimuli suite à l'ingestion de la nourriture lesquelles stimulent la production de l'histamine, de la gastrine et de l'acétylcholine (ACh). La liaison de ces substances chimiques à leurs protéines G respectives localisées du côté basolatéral des cellules pariétales, active des voies signalétiques pour la libération par transport actif de protons (H^+) dans la lumière de l'estomac au moyen de pompe à protons (figure 1.6c). En même temps que les H^+ , des ions chlorure (Cl^-) sont aussi envoyés par diffusion dans la lumière de l'estomac afin de maintenir l'équilibre électrique à l'intérieur de l'estomac et ainsi produire le HCl (figure 1.6c). Le mécanisme de production du HCl par les cellules pariétales est rétro-régulé par l'organisme ce qui permet à l'estomac de retrouver un pH moins acide à la suite de la digestion et de le maintenir tout aussi longtemps que l'estomac est à jeun (tableau 1.1).

Les cellules principales produisent le pepsinogène qui est le précurseur de la pepsine, une enzyme protéolytique. L'activation du pepsinogène en pepsine est le résultat d'une hydrolyse

acide par le HCl sécrété par les cellules pariétales (Washington, Washington et Wilson, 2001). L'efficacité protéolytique maximale de la pepsine se situe à une valeur de pH de 2.0 et elle est inactivée par une valeur de pH supérieur à 6.0 (Tortora et Grabowski, 2000). Les cellules principales sécrètent également la lipase gastrique, l'amylase gastrique et la gélatinase qui constituent, avec la pepsine, la totalité de l'arsenal enzymatique de l'estomac (Washington, Washington et Wilson, 2001). Toutefois, au contraire de la pepsine, l'action de ces dernières enzymes est moindre dans le processus de digestion des aliments. En effet, la lipase gastrique est spécifique à la tributyrine qui est essentiellement retrouvée dans le beurre, l'amylase gastrique joue un rôle mineur dans la digestion des amidons et la gélatinase aide à liquéfier certains protéoglycanes (Washington, Washington et Wilson, 2001).

Malgré les mécanismes de protection offerts par la présence de la couche de mucus présentée ci-dessus, les cellules épithéliales gastriques sont tout de même attaquées par les conditions acides existantes dans l'estomac dû, entre autre, à la perturbation de la couche de mucus par les solides contenus dans le bol alimentaire. L'épithélium gastrique possède une importante RETE intrinsèque qui lui permet de résister sans dommage apparent à une exposition prolongée aux conditions acides (Allen *et al.*, 1993). Particulièrement, au fond des glandes gastriques, la face externe de la membrane plasmique des cellules glandulaires est imperméable au HCl (Marieb, 1999). Toutefois, les cellules qui sont endommagées sont rapidement éliminées et remplacées par des nouvelles à un rythme de renouvellement complet d'approximativement deux jours pour les cellules à mucus superficielles et de trois à six jours pour les cellules contenues dans les cryptes de l'estomac (Allen *et al.*, 1993 ; Marieb, 1999). Conjointement avec l'épaisse couche de mucus gastrique qui limite la diffusion des PA au travers de celle-ci, ces caractéristiques font qu'il y a très peu d'absorption de nutriments ou de PA au travers de la muqueuse gastrique. En fait, seuls quelques PA avec des caractéristiques spécifiques peuvent y être absorbés (section 1.3).

1.2.3 Intestin grêle

À l'opposé de l'estomac, l'intestin grêle est le site majeur d'absorption des PA à l'intérieur du TGI. L'intestin grêle est le principal organe de digestion dans lequel, suite à des actions mécaniques, chimiques et enzymatiques, la transformation en nutriments des aliments

digestibles se termine. En effet, dans la bouche, l'amylase salivaire convertit l'amidon en oligosaccharides et en maltose, dans l'estomac la pepsine convertit partiellement les protéines en peptides et la lipase gastrique transforme quelques triglycérides en acide gras, en diglycérides et monoglycérides (Tortora et Grabowski, 2000). Ainsi, le chyme qui entre dans l'intestin grêle contient des glucides, des protéines et des lipides tous partiellement digérés. Anatomiquement, l'intestin grêle est un tube avec un diamètre moyen de 2,5 cm qui va du pylore à la valve iléo-caecale (figure 1.1). L'intestin grêle comprend trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléum dont les caractéristiques physiologiques sont présentées dans le tableau 1.1. Ces trois segments se distinguent entre eux par la structure histologique de leur muqueuse et des taux d'absorption au travers de celle-ci (Tortora et Grabowski, 2000). Afin d'accroître significativement la surface d'échange entre la lumière de l'intestin et sa muqueuse, la muqueuse de l'intestin grêle forme des crêtes permanentes (plis circulaires) d'environ 10 mm de haut ainsi que des villosités, qui sont des saillies digiformes mesurant de 0,5 à 1 mm de long (figure 1.3). Dans le duodénum, les villosités sont très nombreuses et en forme de feuillet, tandis que leur taille augmente dans le jéjunum, leur nombre diminue depuis le duodénum et tout le long de l'intestin jusqu'à l'iléum (Washington, Washington et Wilson, 2001). L'épithélium de la muqueuse intestinale est du type simple prismatique et contient des cellules absorbantes, des cellules caliciformes, des cellules entéro-endocrines et des cellules à granules acidophiles dont la distribution varie selon leur position sur la muqueuse (figure 1.7a).

Les villosités sont recouvertes exclusivement de cellules absorbantes et de cellules caliciformes (figure 1.7a). Ces cellules se renouvellent complètement tous les trois à six jours (Marieb, 1999). Les membranes apicales des cellules absorbantes sont caractérisées par des microvillosités, chacune de celles-ci est un prolongement cylindrique de la membrane, qui mesure 1 μm de long et qui contient 20 à 30 filaments d'actine, formant collectivement la bordure en brosse (Tortora et Grabowski, 2000). En plus d'augmenter la surface d'absorption, les cellules épithéliales absorbantes synthétisent plusieurs enzymes digestives (enzymes de la bordure de brosse) qu'elles insèrent dans la membrane plasmique des microvillosités. Parmi ces enzymes, on retrouve celles qui catalysent la digestion des glucides (α -dextrinase, maltase, glucoamylase, sucrase et la lactase), des protéines (aminopeptidase et

dipeptidase) et des nucléotides (nucléosidases et phosphatase) (Tortora et Grabowski, 2000). Les cellules caliciformes, dont le nombre augmente le long de l'intestin grêle, produisent le mucus intestinal (Marieb, 1999). L'épaisseur de la couche de mucus à la surface de l'épithélium intestinal est d'environ 50 μm , mais peut atteindre une épaisseur jusqu'à 450 μm dans certaines régions localisées de l'intestin (MacAdam, 1993).

Entre les villosités, la muqueuse intestinale est parsemée de dépressions profondes tapissées d'épithélium glandulaire appelées glandes intestinales de l'intestin grêle (figure 1.7a). Ces glandes sécrètent le suc intestinal qui est un mélange d'eau et de mucus (produit par les cellules caliciformes se retrouvant dans les glandes) avec un pH entre 7,4 et 7,8 qui sert à transporter les nutriments du chyme en vue de leur absorption (Marieb, 1999). Ces cellules entéro-endocrines et à granules acidophiles sont également présentes dans les glandes intestinales. Les cellules entéro-endocrines sécrètent des hormones reliées au processus de digestion tandis que les cellules acidophiles sécrètent le lysozyme et sont capables de phagocytose (Tortora et Grabowski, 2000). Le nombre de glandes intestinales diminue le long de l'intestin (Marieb, 1999).

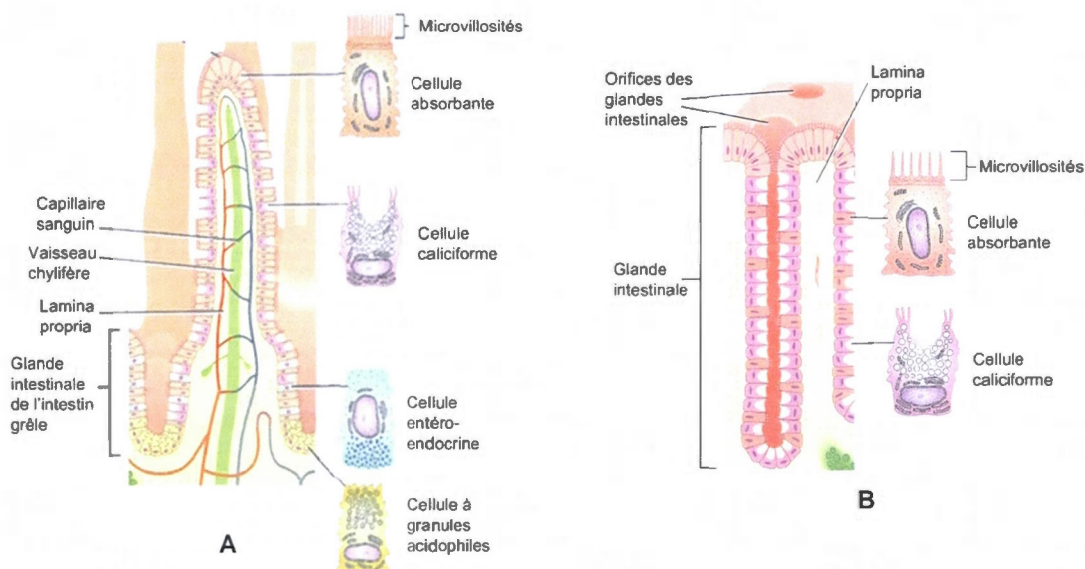


Figure 1.7 Muqueuses A) de l'intestin grêle et B) du gros intestin (adapté de Tortora et Grabowski, 2000).

Le duodénum contient un autre type de glandes, qui lui sont exclusives, les glandes duodénales. Ces glandes, localisées dans la sous-muqueuse, produisent un mucus alcalin riche en HCO_3^- qui contribue à neutraliser le chyme acide provenant de l'estomac. La neutralisation du chyme gastrique est également effectuée par la bile (influence mineure) et le suc pancréatique (influence majeure) provenant de l'ampoule hépato-pancréatique situé dans la première partie du duodénum. La bile (pH 7,6 – 8,6) est un mélange d'eau, d'acides biliaires, de sels biliaires, de cholestérol, de lécithine et de bilirubines qui agit à titre d'agent émulsifiant des graisses, facilitant l'action des enzymes digestives (Washington, Washington et Wilson, 2001). Le suc pancréatique (pH 7,1 - 8,2) est composé d'un mélange d'eau, de sels, d'ions HCO_3^- , et de plusieurs enzymes (Tortora et Grabowski, 2000). Les enzymes du suc pancréatique comprennent l'amylase pancréatique, qui digère les glucides, la trypsine, la chymotrypsine, la carboxypeptidase et l'élastase, qui s'attaquent aux protéines, la lipase pancréatique, qui digère les triglycérides et enfin la ribonucléase et la désoxyribonucléase, qui catalysent la dégradation des acides nucléiques. Particulièrement, l'amidon, qui n'a pas été dégradé en oligosaccharides par l' α -amylase salivaire, est attaqué par l' α -amylase pancréatique. Cette dégradation de l'amidon par l'action de l' α -amylase pancréatique est rapide. En effet, en moins de dix minutes environ après être entré dans l'intestin grêle, l'amidon est entièrement converti en divers oligosaccharides (Marieb, 1999). Par la suite, les enzymes intestinales de la bordure en brosse spécifiques aux glucides précédemment mentionnées, catalysent la dégradation des oligosaccharides en glucose afin de permettre l'absorption de ce dernier par les cellules absorbantes.

1.2.4 Gros intestin

Le gros intestin constitue la partie terminale du tube digestif et comprend trois segments principaux : le cæcum, le colon et le rectum (figure 1.1) dont les caractéristiques physiologiques sont présentées dans le tableau 1.1. Le gros intestin n'intervient pas à proprement dit dans le processus de digestion des aliments, mais a pour fonction de finir l'absorption (principalement de l'eau), de produire abondamment certaines vitamines, de former les fèces et de les expulser du corps (Tortora et Grabowski, 2000). La paroi du gros intestin diffère par plusieurs aspects de celle de l'intestin grêle. En effet, la muqueuse du gros intestin ne possède pas de plis circulaires ni de villosités et est dépourvue de cellules

sécrétrices d'enzymes digestives (figures 1.3 et 1.7b). L'épithélium du gros intestin contient surtout des cellules absorbantes et des cellules caliciformes situées dans de longues glandes tubuleuses droites qui traversent toute l'épaisseur de la muqueuse (figure 1.7b). Le mucus lubrifiant produit par les cellules caliciformes facilite le passage des fèces et protège la paroi intestinale des acides irritants et des gaz libérés par les bactéries résidentes du colon qui assurent les activités métaboliques de celui-ci (Marieb, 1999). La présence d'une grande quantité de mucus et le fait que la muqueuse du gros intestin est très épaisse fait en sorte que la muqueuse du gros intestin est beaucoup moins perméable que celle de l'intestin grêle (Marieb, 1999).

1.3 Biopharmaceutique et pharmacocinétique

La biopharmaceutique est l'étude de l'interdépendance des propriétés physico-chimiques des PA et des formes pharmaceutiques basé sur les performances biologiques (Shargel et Yu, 2007). Ainsi, pour les PA administrés par voie orale sous forme solide, la biopharmaceutique implique l'étude des facteurs qui influencent la libération des PA de la forme solide, les taux de dissolution des PA au site d'absorption et l'absorption systémique du médicament (Shargel, Wu-Pong et Yu, 2004). La connaissance des propriétés biopharmaceutiques d'un PA administré par voie orale permet la conception rationnelle de la forme solide afin de délivrer le PA à un taux et à un endroit spécifique dans le TGI dans le but d'optimiser l'effet thérapeutique et de minimiser les effets néfastes du PA. Cette conception rationnelle d'une forme solide est inhérente à la connaissance des propriétés pharmacocinétiques du PA. La pharmacocinétique est l'étude des relations entre les processus d'absorption, de distribution, de métabolisation (biotransformation) et d'excrétion d'un PA et des effets thérapeutiques ou indésirables du PA dans le temps (abrévié collectivement par ADMET) (Sutton, Cato et Cato, 2007). Les relations entre les propriétés biopharmaceutiques et pharmacodynamiques de formes solides administrées oralement sont présentées dans la figure 1.8. La conception rationnelle d'une forme solide est également inhérente à la connaissance des propriétés pharmacodynamiques du PA *i.e.* les effets biochimiques et physiologiques que le PA produit sur l'organisme par son action au niveau d'un tissu ou d'un récepteur (Xuan et Choe, 2007). Puisque les caractéristiques pharmacodynamiques des PA sont spécifiques, elles sont décrites

en termes de durée et d'intensité des effets thérapeutiques dans la présente section. De plus, bien que faisant partie des propriétés biopharmaceutiques, les facteurs qui influencent la libération des PA des formes solides seront abordés dans la section 2.2.3.

1.3.1 Voies d'absorption orales des PA

Il a été sommairement présenté dans la section 1.2 que à la suite de sa libération de la forme solide et sa solubilisation dans les fluides de la lumière du TGI, les PA doivent franchir deux barrières physiologiques, la couche de mucus à la surface des parois du TGI et la barrière épithéliale (épithélium) afin d'être absorbés par l'organisme.

Le mucus est une barrière à l'absorption des PA puisqu'il forme une couche de gel immobile riche en glycoprotéines que les PA doivent traverser par diffusion avant de rejoindre la surface apicale de la barrière épithéliale (MacAdam, 1993). Le taux de diffusion d'un PA au travers de la couche de mucus dépend de l'épaisseur de la couche, la viscosité du mucus, du pH du mucus, du poids moléculaire du PA et les interactions entre les PA et les mucines (Hillery, 2001). En effet, certains PA peuvent établir des liaisons associatives (électrostatiques, hydrophobiques, Van der Waals et ponts hydrogène) avec les mucines (MacAdam, 1993). Tel que discuté par Bhat *et al.* (1995, 1996) et Khanvilkar *et al.* (2001), l'influence de la barrière de mucus sur l'absorption des PA est spécifique. Tandis que le mucus représente une barrière significative pour certains PA, dans plusieurs cas celui-ci ajoute uniquement une résistance à la diffusion équivalente à celle d'une couche d'eau immobile d'égale épaisseur. Les petites molécules qui n'interagissent pas avec les mucines diffusent librement dans l'eau au travers du réseau de mucus gélifié. À l'opposé, pour un PA très lipophile, la diffusion au travers de la couche de mucus est l'étape limitant son absorption dans le TGI. La faible magnitude des constantes d'associations suggère que les interactions entre les mucines et le PA ne peuvent être les seuls responsables de la faible absorption de ces PA dans le TGI.

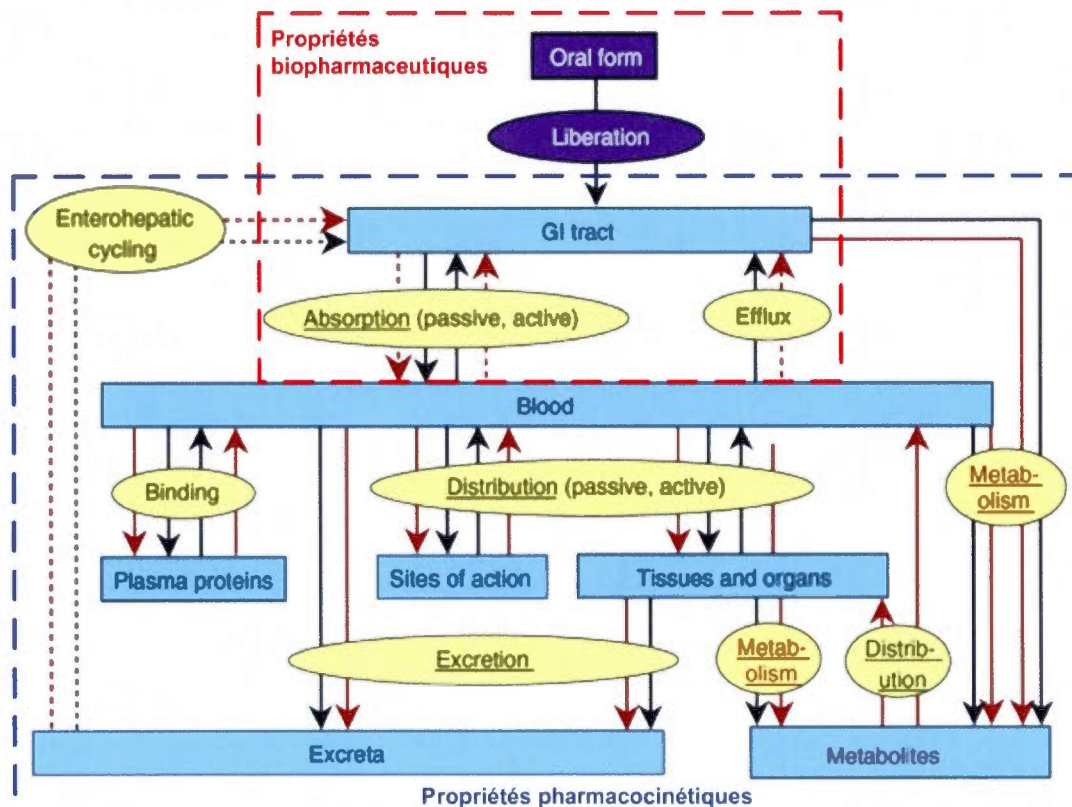


Figure 1.8 Représentation schématique des interrelations entre les composantes principales des propriétés biopharmaceutiques et pharmacocinétiques (adapté de Van de Waterbeemd et Testa, 2007).

À la suite du passage des PA au travers de la couche superficielle de mucus, leur absorption est contrôlée par la barrière épithéliale. L'organisation et l'architecture de la barrière épithéliale contraignent l'absorption des PA, à deux voies principales, soit à travers l'espace intercellulaire (transport paracellulaire) ou à travers la membrane cellulaire (transport transcellulaire) (figure 1.9). L'importance de chacune des voies sur l'absorption des PA est déterminée par les propriétés physico-chimiques des PA et leurs affinités potentielles avec des transporteurs membranaires (Thomas *et al.*, 2006) tel que présenté dans les sections ci-dessous.

Le transport paracellulaire est une voie d'absorption passive empruntée par des molécules hydrophiles (petites molécules, peptides) qui peuvent passer à travers les jonctions serrées entre les cellules épithéliales (figure 1.9 voie B) (Hillery, 2001). Seuls les PA ayant un rayon hydrodynamique inférieur à 11 Å peuvent être absorbés par cette voie en conditions normales (Adson *et al.*, 1994). Puisque les taux de transport paracellulaire dépendent des jonctions serrées, leur ouverture par un facteur externe (ex. Ouvreur de jonction épithéliale JO-1, cytochalasine D) peut résulter en une augmentation significative de l'absorption des PA au travers de la barrière épithéliale (Mrsny, 2005). Les forces gouvernant la diffusion passive paracellulaire proviennent des gradients de potentiel électrochimique issus des différences de concentration, de potentiel électrique et de pression hydrostatique entre les côtés apical et basolatéral de la barrière épithéliale (Grassi, 2007).

Le transport transcellulaire implique le mouvement des PA au travers (1) de la membrane apicale, (2) du cytoplasme et (3) de la membrane basolatérale des cellules épithéliales au moyen de différents mécanismes. Un premier mécanisme emprunté par les PA lipophiles de faible masse moléculaire pour traverser la barrière épithéliale est la diffusion passive (figure 1.9 voie A). La diffusion passive transcellulaire est la voie d'absorption principale des PA non chargés (Shargel et Yu, 2007). En effet, l'assemblage des membranes plasmiques à partir de lipides amphiphiles forme une barrière très imperméable à la majorité des molécules polaires ou chargées (Hillery, 2001). Selon la loi de diffusion de Fick, les forces contrôlant le taux de diffusion passive au travers de la barrière épithéliale sont les gradients de concentration de part et d'autre de chaque membrane plasmique à partir de la lumière du TGI, relativement avec la perméabilité des PA (Calcagno et Siahaan, 2005 ; Hillery, 2001).

La présence de protéines associées à la multirésistance aux médicaments (PRM) peut affecter la diffusion passive transcellulaire (figure 1.9 voie D). Les PRM appartiennent à la famille des transporteurs ABC (*ATP binding cassette*) et sont localisées dans la bordure en brosse des cellules absorbantes au sommet des villosités intestinales (Calcagno et Siahaan, 2005). Le rôle de ces protéines est de protéger l'organisme contre les substances exogènes potentiellement toxiques. Les PRM agissent comme des pompes qui provoquent l'efflux du PA (substrat) hors de la cellule vers la lumière du TGI. La P-glycoprotéine (P-gp, PRM1) est

l'une des premières PRM qui a été identifiée comme ayant un rôle significatif dans l'absorption de certains PA (Taub *et al.*, 2005). La spécificité de substrat des P-gp couvre un grand nombre de structures moléculaires pour lesquelles l'affinité au substrat peut varier selon leur position dans l'intestin (Martinez et Amidon, 2002). La concentration des P-gp augmente depuis le duodénum jusqu'au gros intestin (Calcagno et Siahaan, 2005).

En plus des transporteurs d'efflux décrits ci-dessus, des transporteurs d'influx sont également présents sur la barrière épithéliale. Dans ce cas, des protéines transmembranaires spécialisées peuvent transporter les PA à travers les membranes plasmiques des cellules épithéliales, soit contre le gradient de concentration (transport actif) ou avec le gradient de concentration (diffusion facilitée) (figure 1.9 voie C) (Hillery, 2001). Afin de contrer le gradient de concentration, le transport actif requiert un apport énergétique de la part de l'organisme. Les protéines de transport actif d'influx appartiennent également à la famille des transporteurs ABC (Shargel, Wu-Pong et Yu, 2004). La diffusion facilitée ne requière pas d'énergie de la part de l'organisme et permet d'accroître les taux d'absorption des PA au-delà de ceux attendus sur la base des propriétés physico-chimiques des PA (Hillery, 2001). Bien que la plupart des transporteurs soient situés sur la surface apicale, certains sont situés uniquement sur la surface de la membrane basolatérale (Calcagno et Siahaan, 2005). Le transport transcellulaire associé aux transporteurs membranaires est réservé aux PA qui présentent une grande homologie structurelle avec les substrats naturels du transporteur. Puisque seulement un certain nombre de transporteurs est disponible, les deux mécanismes (facilité et actif) peuvent devenir saturés à des hautes concentrations de PA dans la lumière du TGI (Shargel et Yu, 2007). À l'opposé, les mécanismes de diffusion passive transcellulaire ou paracellulaire ne sont pas saturables (Shargel et Yu, 2007). En fait, la diffusion passive est le mécanisme d'asorption le plus commun des différents PA (Thomas *et al.*, 2006).

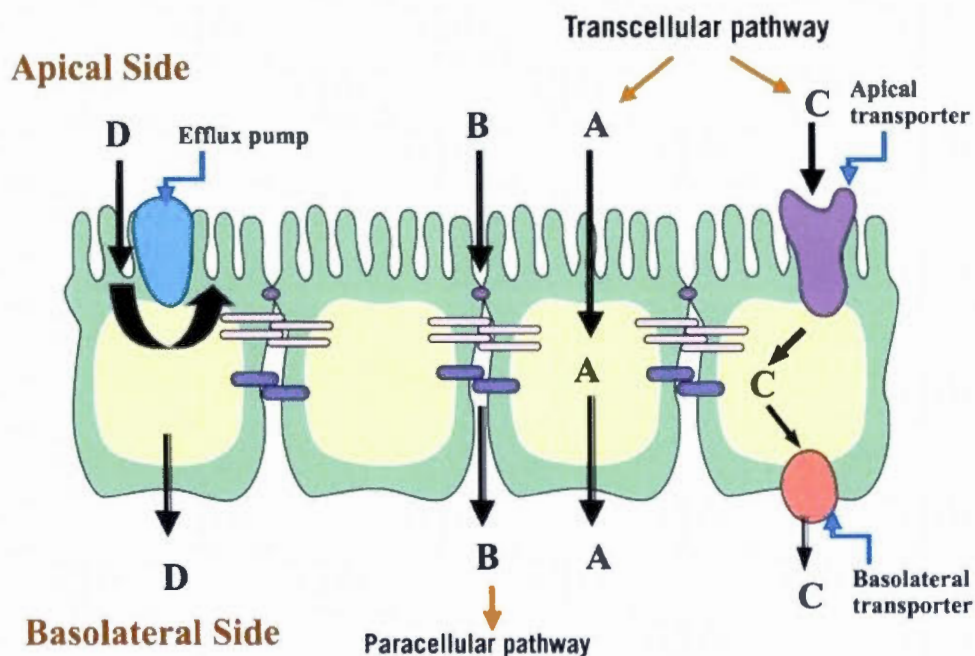


Figure 1.9 Voies d'absorption des PA au travers des barrières épithéliales du TGI. A) Diffusion passive transcellulaire, B) diffusion passive paracellulaire, C) diffusion facilitée ou transport transcellulaire associé aux transporteurs membranaires et D) transport transcellulaire modifié par les protéines associées à la multirésistance aux médicaments (PRM) (Calcagno et Siahaan, 2005).

1.3.2 Profils et paramètres pharmacocinétiques

L'absorption dans le temps des PA décrit ci-dessus s'inscrit dans les propriétés pharmacocinétiques du PA. Ces propriétés sont interdépendantes avec les propriétés de libération de la forme solide administrée oralement (figure 1.8). En fait, puisque chaque aspect de la pharmacocinétique du PA (absorption, distribution, métabolisme et excrétion) peut influencer l'efficacité thérapeutique du médicament, ce sont les paramètres pharmacocinétiques qui dicteront ultimement le design de la forme pharmaceutique solide (Uchizono, 2010). L'administration d'un médicament peut se caractériser au moyen d'un profil pharmacocinétiques que l'on obtient par la quantification de la concentration plasmatique du PA dans le temps (figure 1.10). Trois phases distinctes composent ce profil : la phase d'absorption, la phase postabsorption et la phase d'élimination (Shargel et Yu, 2007). La phase d'absorption correspond à la phase où l'absorption du PA est supérieure à

son élimination par l'organisme. L'élimination du PA de l'organisme inclut sa métabolisation et son excrétion respectivement effectués, en général, dans le foie et par les reins. La métabolisation du PA s'effectue par l'altération de la structure chimique au moyen d'enzymes (Hillery, 2001). Parmi ces enzymes, les enzymes cytochrome P450 (CYP) sont responsables de la métabolisation de plus de 50 % des PA (Humphreys, 2005). Les CYP sont également présents dans les parois intestinales et bien que ceux-ci sont à des concentrations 20 fois inférieures à celles se retrouvant dans le foie, leur activité métabolique demeure significative (Calcagno et Siahaan, 2005). La présence de ces CYP dans le TGI représente une autre barrière, cette fois enzymatique, à l'absorption des PA.

La phase d'absorption a pour origine la prise du médicament et se termine au temps (t_{\max}) où la valeur maximale de concentration plasmatique du PA est atteinte (C_{\max}) (figure 1.10). La libération du PA à partir de la forme pharmaceutique devrait permettre d'atteindre une valeur de C_{\max} supérieure à la concentration effective minimale (CEM) nécessaire pour atteindre l'effet pharmacodynamique désiré, mais inférieure à la concentration toxique minimale (CTM) afin de minimiser les effets secondaires ou néfastes du PA sur l'organisme. Le temps nécessaire à l'atteinte de la CEM est appelé délai d'activité. Le temps à partir du délai d'activité jusqu'au point où la concentration plasmatique du PA revient sous le niveau de la CEM correspond à la durée des effets thérapeutiques. La différence entre la valeur de C_{\max} et la valeur de CEM correspond à l'intensité des effets thérapeutiques. La phase postabsorption est la phase où l'élimination du PA est supérieure à son absorption ce qui entraîne une diminution de la concentration plasmatique du PA. Lors de la phase d'élimination, le taux de diminution de la concentration plasmatique du PA est supérieur puisque celui-ci n'est plus absorbé par l'organisme. Le profil pharmacocinétique permet également d'évaluer l'étendue de la biodisponibilité du PA par la quantité totale de PA qui rejoint la circulation générale ce qui correspond à l'aire totale sous courbe (ASC) (Zanowiak, 2000).

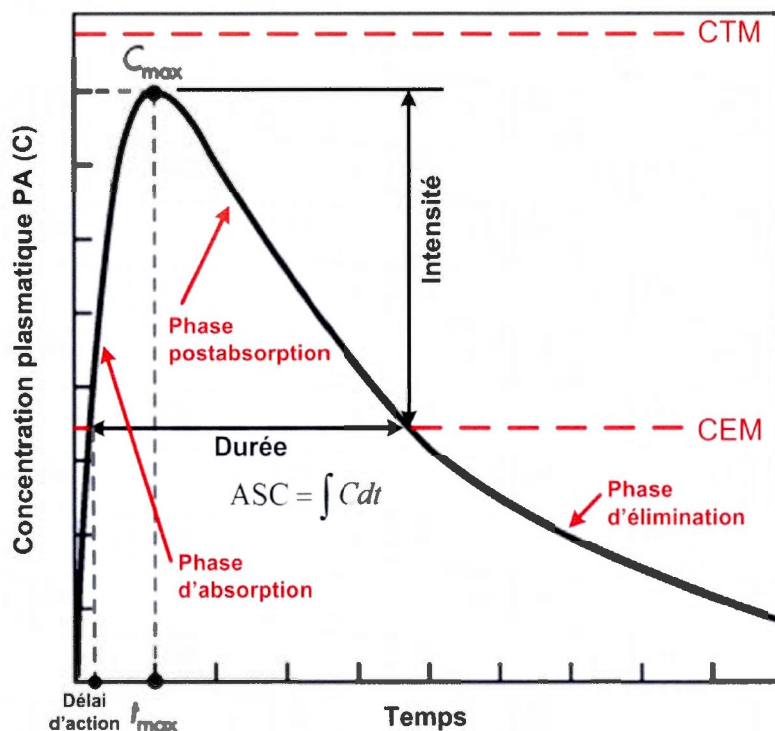


Figure 1.10 Profil pharmacocinétique typique d'un PA administré par voie orale (adapté de Shargel, Wu-Pong et Yu, 2004).

1.3.3 Propriétés physico-chimiques et considérations biopharmaceutiques influençant la biodisponibilité des PA.

Les propriétés physico-chimiques des PA sous forme solide et en solution, en respect avec l'ensemble des différentes conditions physiologiques se retrouvant dans le TGI présentées dans la section 1.2 et résumées dans la figure 1.11a, affectent directement la biodisponibilité de PA. *In vivo*, en faisant abstraction des propriétés des formes solides, les propriétés biopharmaceutiques de solubilité, de perméabilité et de stabilité des PA sont les facteurs principaux qui détermineront la biodisponibilité du PA (figure 1.11b) (Wen et Park, 2010a). Amidon *et al.* (1995) ont proposé de classier les PA selon un système de classification biopharmaceutique (BCS) comprenant quatre classes distinctes sur la base de la solubilité aqueuse et la perméabilité au travers des barrières épithéliales intestinales des PA (figure 1.11c). Ils définissent un PA comme étant fortement soluble lorsque sa plus haute dose

administrable est soluble dans 250 mL ou moins de solutions tampons sur la plage de pH de 1 à 8. Un PA est jugé fortement perméable lorsque son degré d'absorption chez l'humain est supérieur à 90 % de la dose administrée.

La solubilité d'un PA est fonction de plusieurs facteurs, soit sa distribution de taille de particule, son polymorphisme, son hydrophobicité, sa forme sodique ou libre et son niveau d'hydratation. Afin d'améliorer la solubilité des PA, certaines actions sont proposées sur la figure 1.11b. Toutefois, au-dessus de ces facteurs, la constante de dissociation des acides (pKa) des PA chargés est le facteur premier qui détermine sa solubilité dans les fluides physiologiques du TGI (Barich, Munson et Zell, 2005 ; Lee et Yang, 2001). La forme ionisée d'un PA présente une plus grande solubilité aqueuse que sa forme non ionisée. Selon l'équation de Henderson et Hassebalch (Florence et Attwood, 2006), le ratio de molécules ionisées (I) sur celles non ionisées (NI) pour les acides faibles correspond à :

$$\text{pH}-\text{pKa}=\log \frac{[\text{I}]}{[\text{NI}]} \quad (1.1)$$

et pour les bases faibles:

$$\text{pKa}-\text{pH}=\log \frac{[\text{I}]}{[\text{NI}]} \quad (1.2)$$

Ainsi, la solubilité des acides faibles augmente avec l'augmentation du pH tandis que la solubilité des bases faibles diminue avec l'augmentation du pH.

La perméabilité des PA au travers de la barrière épithéliale est également affectée par le ratio de molécules ionisées sur celles non ionisées. En effet, tel que mentionné dans la section 1.3.1, seuls les PA non chargés (non polaire) peuvent traverser les membranes plasmiques des cellules par diffusion passive. Ainsi, la perméabilité des acides faibles augmente avec la diminution du pH tandis que la perméabilité des bases faibles diminue avec la diminution du pH. La dépendance de l'absorption des PA au pH des fluides physiologiques du TGI se nomme « l'hypothèse du coefficient de partage ionique » (traduction libre de « *pH-partition hypothesis* »). Ce phénomène explique pourquoi certains PA acides ou très faiblement

basiques peuvent être absorbés au travers de la barrière épithéliale gastrique (Hogben *et al.*, 1959 ; Talukder et Fassihi, 2004). Toutefois, malgré une perméabilité intestinale plus faible, étant donnée la faible surface de la barrière épithéliale gastrique vis-à-vis celle intestinale (tableau 1.1), il se peut que cette absorption gastrique demeure marginale par rapport à celle intestinale (Omidian et Park, 2010). Le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) des PA a également une influence sur leur perméabilité (Hillery, 2001). Un PA hydrophobe diffusera plus facilement au travers des membranes plasmiques qu'un PA hydrophile. Toutefois, un PA hydrophobe est moins soluble qu'un PA hydrophile. Il est intéressant de constater que le pK_a et le caractère hydrophobe ou hydrophile ont une influence opposée sur la solubilité et la perméabilité des PA. En pratique, un équilibre entre tous ces facteurs est requis pour assurer l'absorption des PA dans le TGI (Hillery, 2001).

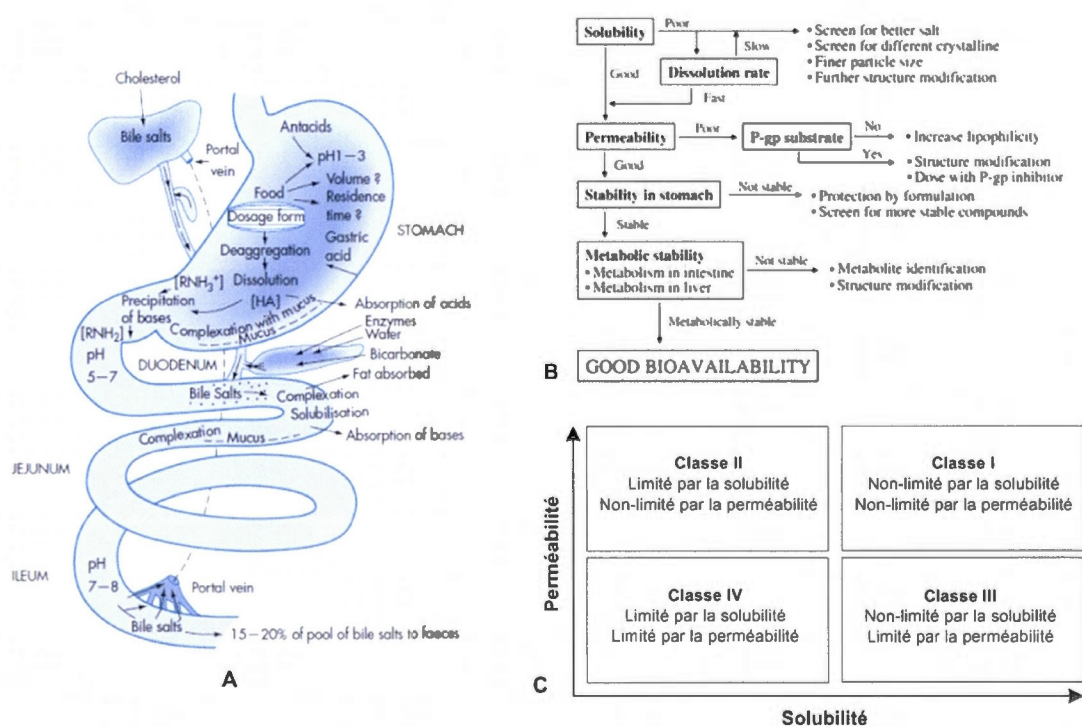


Figure 1.11 Propriétés physico-chimiques et considérations biopharmaceutiques influençant la biodisponibilité des PA. A) Conditions physiologiques du TGI pouvant influencer l'absorption des PA (Florence et Attwood, 2006), B) propriétés biopharmaceutiques déterminant la biodisponibilité des PA (Han et Wang, 2005) et C) système de classification biopharmaceutique.

La stabilité des PA dans le TGI correspond à leur capacité à conserver l'intégrité de leurs structures physique et chimique dans les différents fluides physiologiques présents dans la lumière des organes du TGI (Barich, Munson et Zell, 2005). La stabilité physique des PA réfère au maintien de la forme physique soit, son polymorphisme et son état de solvation lequel pouvant influencer directement les propriétés de solubilité et de perméabilité des PA (Brittain, 2012). La stabilité chimique des PA réfère à leur capacité à conserver l'intégrité de leur structure moléculaire dans le TGI (Barich, Munson et Zell, 2005). Le maintien de la structure moléculaire des PA est essentiel afin que ceux-ci puissent se lier avec leur cible thérapeutique (Hillery, 2001). La dégradation chimique des PA dans TGI peut s'effectuer par des réactions chimiques ou enzymatiques. L'estomac, avec ses conditions acides extrêmes (tableau 1.1), est le site préférentiel de dégradation chimique des PA par hydrolyse acide. Tel que suggéré dans la figure 1.11b, la stabilité chimique des PA peut être assurée par le développement d'une forme solide appropriée. L'intestin grêle est la région préférentielle pour la dégradation enzymatique (métabolique) des PA dû à la grande concentration d'enzymes provenant du suc pancréatique (section 1.2.3) et de celles localisées dans la bordure en brosse de l'épithélium intestinal tel que par exemple les CYP précédemment mentionnés.

1.4 Modèles *in vitro* des barrières épithéliales

La perméabilité des PA au travers des barrières épithéliales n'est pas une propriété intrinsèque des PA, mais dépend de plusieurs facteurs tels qu'il a été discuté dans la précédente section. Afin de caractériser, de modéliser et dans une certaine limite prédire l'absorption des PA, des essais de perméabilité *in vitro* ont été développés tel que ceux basés sur l'utilisation de muqueuses du TGI prélevées sur des animaux modèles (*ex vivo*) (Palumbo *et al.*, 2008 ; Schwartz *et al.*, 2003), de modèles cellulaires des barrières épithéliales (Adson *et al.*, 1994 ; Balimane et Chong, 2005 ; Gao *et al.*, 2000 ; Hubatsch, Ragnarsson et Artursson, 2007), de colonne chromatographique avec membrane artificielle immobilisée (Ong, Liu et Pidgeon, 1996 ; Pidgeon *et al.*, 1995) et de membrane artificielle (parallel artificial membrane permeation assay, PAMPA) (Kansy, Senner et Gubernator, 1998). Ces deux dernier sont les plus récent types d'essai de perméabilité *in vitro* et se veulent des tests plus rapide, moins onéreux et plus standardisé que les autres types de test de perméabilité.

Toutefois, l'utilisation de ces méthode pour l'évaluation de l'absorption par voie orale demeure pour le moment incertaine (Obata *et al.*, 2004). De façon similaire, la variabilité entre les spécimens ainsi que le contrôle des conditions expérimentales peuvent apporter une incertitude élevée lors de l'utilisation du premier type d'essai de perméabilité (*ex vivo*). Ceci à pour conséquence que les essais de perméabilité avec des modèles cellulaires des barrières épithéliales sont la méthode standard dans l'industrie pharmaceutique.

Sommairement, les essais de perméabilité basés sur les modèles cellulaires des barrières épithéliales reposent sur la formation d'une monocouche de cellules épithéliales confluentes sur un support poreux (figure 1.12). Lorsque la monocouche de cellules possède les caractéristiques de barrières épithéliales souhaitées, la caractérisation de la perméabilité apparente (P_{app} , cm/s) d'un PA est possible en quantifiant la quantité de PA transportées par unité de temps au travers de la monocouche de cellules à partir du compartiment apical jusqu'au compartiment basolatéral ou vis-versa selon l'équation suivante :

$$P_{app} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \left(\frac{1}{AC_o} \right) \quad (1.3)$$

où dQ/dt est le flux de PA en régime permanent ($\mu\text{mol/s}$), A est la surface de la monocouche (cm^2) et C_o est la concentration initiale (μM) de PA dans le compartiment donneur.

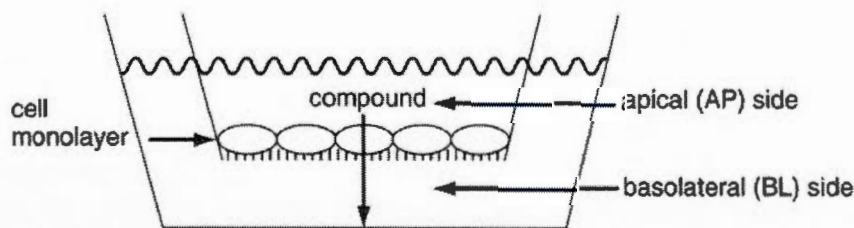


Figure 1.12 Représentation schématique d'une monocouche de cellules épithéliales cultivées sur un support perméable (Gao *et al.*, 2000).

Il est important de spécifier que ces tests ne sont pas des quantifications absolues de la perméabilité que le PA possède *in vivo* dues aux grandes différences qui existent entre les barrières épithéliales *in vivo* et *in vitro* (figure 1.13). De plus, le phénotype des barrières épithéliales modèles est souvent sensible aux conditions de culture et de maintien des cellules, ce qui peut apporter des différences dans l'évaluation du PA d'un laboratoire à l'autre (Tavelin *et al.*, 2002). Toutefois, ces modèles cellulaires des barrières épithéliales demeurent des outils utiles pour cribler les différents PA dans leur stade précoce de développement (Artursson *et al.*, 2007). Ces outils sont également très utiles pour évaluer l'influence des excipients ou des formes solides sur la perméabilité des PA (Rege *et al.*, 2001). Les sections suivantes présentent différentes lignées cellulaires utilisées comme modèles des barrières épithéliales gastriques et intestinales.

1.4.1 Barrières épithéliales gastriques

Afin d'étudier la perméabilité gastrique des PA et la physiologie gastrique, quelques chercheurs ont développé *in vitro* des modèles de barrières épithéliales gastriques à partir de cultures primaires originaires de différents animaux. Rutten *et al.* (1985) et Kavvada *et al.* (2005) ont utilisé des cellules épithéliales provenant d'estomac de cobaye commun, Spencer *et al.* (1992) provenant de lapin et Chen *et al.* (1994) provenant d'estomac de chien. Ces lignées primaires, lorsque cultivées sur des filtres poreux, présentaient des caractéristiques de formation de jonctions serrées (RETE de 75 à 1000 $\Omega\cdot\text{cm}^2$), de différenciation et de polarité cellulaire typique des épithéliums gastriques. De plus, ces lignées épithéliales gastriques présentaient, pour la plupart, une bonne résistance luminale au pH acide, jusqu'à un pH de 2.5. Toutefois, dû à l'hétérogénéité des cellules épithéliales gastriques (section 1.2.2), ces lignées de cultures primaires contenaient une forte proportion de cellules à mucus du collet et de cellules pariétales correspondantes à un épithélium des glandes gastriques plutôt que superficiel. Ces modèles étaient également régulièrement contaminés par la présence de fibroblastes (Konda et Chiba, 2002) et ils n'étaient possible de les utiliser que sur un nombre restreint de passages.

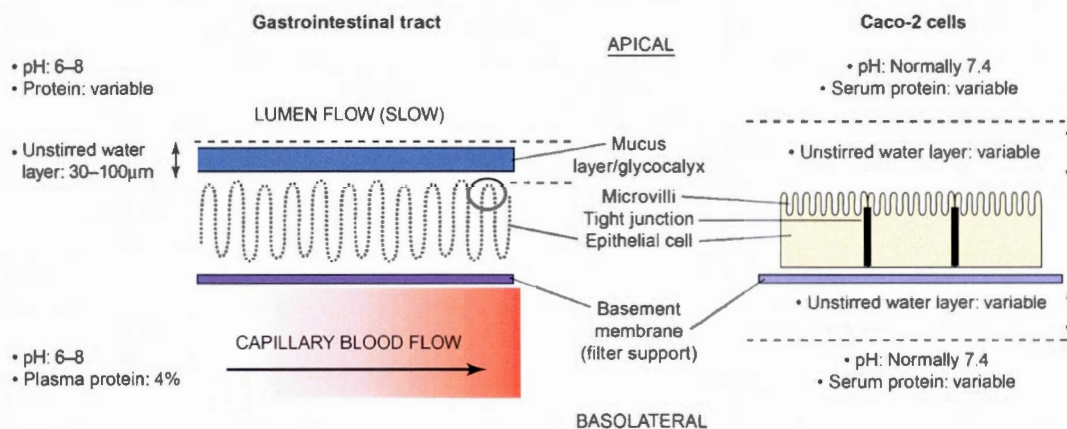


Figure 1.13 Comparaison des barrières épithéliales *in vivo* et *in vitro* (Youdim, Avdeef et Abbott, 2003).

L'idéal pour étudier la perméabilité gastrique des PA et les effets des formes pharmaceutiques sur l'absorption au travers de la barrière épithéliale serait de pouvoir utiliser une lignée cellulaire épithéliale gastrique humaine immortalisée, analogue au modèle Caco-2 de l'épithélium intestinal (section 1.4.2) (Kavvada *et al.*, 2005). Il existe plusieurs lignées cellulaires établies à partir d'adénocarcinome gastrique humain (AGS, Hs746t, KATO-III et NCI-N87) (Park *et al.*, 1990). Parmi celles-ci, Basque *et al.* (2001) ont trouvé que la lignée NCI-N87 présentait un statut de différenciation unique lorsque cultivée sur des supports poreux. Les cellules NCI-N87 étaient capables de former une monocouche de cellules différenciées homogènes exprimant le marqueur de jonctions adhérentes E-cadherin et le marqueur de jonctions serrées ZO-1 à la périphérie de certaines sous-populations de cellules, de maintenir une morphologie épithéliale jusqu'à 10 jours postconfluence et de produire à leur surface des agglomérats de mucus contenant la protéine fortement glycosylée mucin 6 (Muc-6), qui est caractéristique des muqueuses gastriques. Par la suite, la lignée NCI-N87 et deux de ses clones ont été utilisés avec succès pour étudier la réépithélisation de l'épithélium gastrique et les influences d'*Helicobacter pylori* sur les jonctions serrées des barrières épithéliales gastriques (Chailler et Ménard, 2005 ; Jung *et al.*, 2006 ; Tétreault *et al.*, 2005). Ces caractéristiques suggèrent que la lignée NCI-N87 pourrait être également utilisée pour étudier la perméabilité gastrique des PA.

1.4.2 Barrières épithéliales intestinales

Au contraire des barrières épithéliales gastriques, il existe une grande variété de lignées cellulaires modèles de la barrière épithéliale intestinale utilisées couramment pour caractériser la perméabilité intestinale des PA (Tableau 1.2). Ces différents modèles ont été développés afin que ceux-ci présentent des caractéristiques particulières dans le but d'étudier les différents mécanismes d'absorption des PA ou des propriétés physiologiques des barrières épithéliales intestinales.

La lignée cellulaire Caco-2 est le modèle le plus populaire et le plus intensivement caractérisé pour l'étude de la perméabilité intestinale des PA puisque ce modèle présente des caractéristiques uniques (Artursson *et al.*, 2007 ; Balimane et Chong, 2005 ; Balimane, Han et Chong, 2006 ; Hubatsch, Ragnarsson et Artursson, 2007 ; Tavelin *et al.*, 2002). En résumé, les cellules Caco-2 subissent une différenciation spontanée en cellules présentant des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles similaires aux cellules absorbantes humaines. Les cellules, lorsque cultivées sur des supports poreux, forment des jonctions serrées et expriment plusieurs enzymes de la bordure en brosse dont les CYP. Plusieurs systèmes de transport actif ont été caractérisés sur cette lignée incluant la présence de transporteur d'efflux (P-gp). Puisque la perméabilité de certains PA à travers les monocouches de cellule Caco-2 corrèle bien avec le degré d'absorption orale chez l'homme, il a été suggéré que les cellules Caco-2 puissent être utilisées pour prédire l'absorption orale humaine des PA (Balimane et Chong, 2005).

L'utilisation intensive des cellules Caco-2 par la communauté scientifique a permis l'établissement de protocoles expérimentaux bien définis pour l'étude de la perméabilité des PA afin d'assurer le développement de leurs caractéristiques mentionnées ci-dessus et ainsi, assurer une qualité certaine dans les résultats de perméabilité obtenus. L'auteur de cette thèse invite les lecteurs à consulter les protocoles décrits dans les publications de Gao *et al.* (2000) et Hubatsch *et al.* (2007) pour plus d'informations à leur sujet. Il a été cependant montré que les cellules Caco-2 sont très sensibles aux différents paramètres et conditions de culture pouvant induire jusqu'à un changement complet du phénotype de la lignée (Delie et Rubas, 1997 ; Hubatsch, Ragnarsson et Artursson, 2007 ; Volpe, 2008). Cette instabilité des cellules

Caco-2 explique dans une certaine mesure la variabilité des données quelques fois obtenue entre différents laboratoires. L'utilisation des résultats obtenus avec les cellules Caco-2 devrait donc être toujours effectuée avec un regard critique et un certain discernement. Toutefois, la lignée Caco-2 demeure un outil utile dans le criblage des PA dans leur stade précoce de développement (Hubatsch, Ragnarsson et Artursson, 2007).

Tableau 1.2 Lignées cellulaires modèles de la barrière épithéliale intestinale utilisées pour évaluer la perméabilité des PA (adapté de Balimane et Chong, 2005 ; Tavelin *et al.*, 2002)

Lignée cellulaire	Origine	Caractéristiques
Caco-2	Adénocarcinome du côlon humain	Cellules différenciées similaires aux cellules absorbantes (présence de villosités) Expression transporteurs d'efflux Expression transporteurs influx variable
MDCK	Épithélium de rein de chien	Cellules polarisées Expression transporteurs ABC Expression transporteurs d'efflux très faible Idéal pour transfection
LLC-PK1	Épithélium de rein de cochon	Expression transporteurs ABC Expression transporteurs d'efflux très faible Idéal pour transfection
2/4/A1	Épithélium intestinal de fœtus de rat	Cellules différenciées similaires aux cellules des glandes intestinales Différenciation sensible à la température Expression transporteurs ABC Idéal pour étude transport paracellulaire
TC-7	Clone de Caco-2	Similaire au Caco-2
HT-29	Épithélium du côlon humain	Cellules différenciées similaires aux cellules caliciformes Formation couche mucus superficielle
IEC-18	Épithélium intestinal de fœtus de rat	Barrière taille-sélective pour l'étude du transport paracellulaire

CHAPITRE II

SYSTÈMES D'ADMINISTRATION DES MÉDICAMENTS PAR VOIE ORALE

2.1 Contrôle de la libération des médicaments

Pour atteindre et maintenir la concentration plasmatique des PA à l'intérieur de leur étendue thérapeutique, il est souvent nécessaire de prendre plusieurs doses de médicaments par jour. Dans le cas où la forme solide se caractérise par une libération immédiate (figure 2.1a), cette prise répétée de médicaments a pour conséquence d'induire d'importante variation de la concentration plasmatique du PA, parfois même, au-delà de la CTM (figure 2.1b). Idéalement, le profil pharmacocinétique du PA devrait se caractériser par une concentration plasmatique constante entre la CEM et la CTM sur une période de temps désiré.

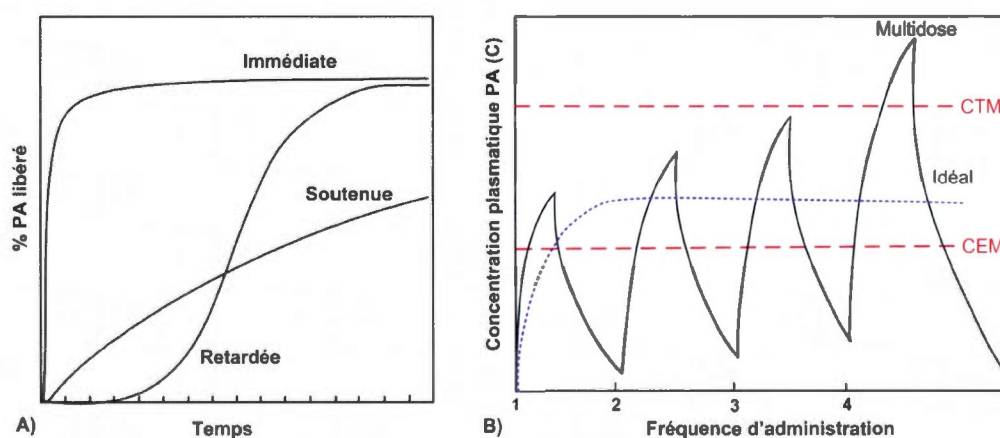


Figure 2.1 Contrôle de la libération des médicaments. Représentation schématique A) des types de libération des PA à partir des formes solides et B) profil pharmacocinétique d'une administration multidose de médicament et profil pharmacocinétique idéal.

L'obtention de ce profil pharmacocinétique idéal est l'une des principales raisons qui a motivé l'émergence des formes solides à libération contrôlée. Lors de l'introduction des premières formes solides à libération contrôlée dans la décennie 1950-60, l'objectif du contrôle de la libération des médicaments était de soutenir les taux de libération des PA à partir des formes solides sur des durées étendues avant la complète libération de ceux-ci dans le TGI (figure 2.1a). Rapidement, au début des années 1970, l'objectif du contrôle de la libération s'est étendu pour inclure les concepts de spécificité spatiale pour la libération des PA dans le TGI, de promotion de la précision et de la fiabilité des taux de libération des PA à partir des formes solides, de protection des PA et d'augmentation de l'absorption des PA. Tous ces concepts s'inscrivent dans le but ultime d'améliorer la biodisponibilité des PA et l'efficacité thérapeutique des formes solides administrées par voie orale. Un exemple simple illustrant ces concepts est les formes solides à libération retardées (figure 2.1a). Ces formes permettent de protéger les PA contre la dégradation par les conditions acides de l'estomac (tableau 1.1) avant leur libération dans les intestins où les PA pourront être absorbés et distribués dans l'organisme. Il est intéressant de constater que l'évolution des formes solides à libération contrôlée est directement liée à l'émergence et l'évolution des polymères semi-synthétiques ou synthétiques, particulièrement les polymères hydrophiles, utilisés pour leur élaboration et leur production (Lee et Li, 2010).

En plus de promouvoir l'efficacité thérapeutique des PA, les formes à libération contrôlée procurent les avantages d'accroître l'assiduité des patients au traitement due à une réduction de la fréquence des doses, une diminution de l'incidence ou de l'intensité des effets secondaires, et un accroissement du potentiel commercial desdites formes solides (Qui et Zhang, 2000 ; Ranade et Hollinger, 2004). En contrepartie, les formes à libération contrôlées possèdent également des désavantages potentiels soit, un temps accru pour atteindre la CEM, une augmentation du métabolisme de premier passage, une libération massive du PA dans le TGI, un manque de flexibilité de la dose, une concentration soutenue du PA dans les cas d'effets secondaires graves ou de surdose et une dépense plus importante pour le patient (Ranade et Hollinger, 2004 ; Shaw, 1980). Afin de les minimiser, ces désavantages potentiels renforcent le besoin de bien connaître les propriétés des excipients qui composent les formes solides à libération contrôlée.

2.1.1 Formes solides à libération contrôlée

Due à la grande popularité du contrôle de la libération pour l'administration de PA par voie orale, une multitude de formes solides à libération contrôlée ont été développées au cours des dernières décennies. Ces formes pharmaceutiques peuvent être classifiées selon l'approche physique qui contrôle la libération des PA (Chien et Lin, 2007 ; Lee et Li, 2010 ; Tu *et al.*, 2010) :

- Les systèmes membranaires : Réservoir de PA enrobé d'une membrane qui contrôle le taux de libération (figure 2.2a);
- Les systèmes matriciels : PA dissous ou dispersé dans une matrice qui contrôle le taux de libération (figure 2.2b);
- Les systèmes hybrides : Combinaison des systèmes membranaires et matriciels (figure 2.2c).

Les mécanismes contrôlant la libération des PA à partir de ces formes à libération contrôlée dépendent principalement de la nature hydrophobique ou hydrophile des excipients et de cela qui les composent. Puisque dans le cadre de cette recherche, le CMA est un polymère hydrophile pour l'élaboration de comprimés monolithiques ou de microsphères, la suite de la présente revue de la littérature s'intéressera au contrôle de la libération à partir des systèmes matriciels à base de polymères hydrophiles. Toutefois, l'auteur de cette thèse invite les lecteurs à consulter les publications de Chien et Lin (2007), Heller (1984), Li et Jasti (2010), Uhrich *et al.* (1999) et Wen et Park (2010b) pour la description complète et détaillée de ces systèmes à libération contrôlée.

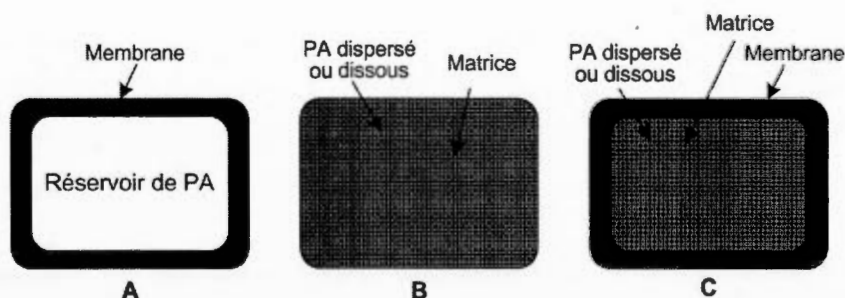


Figure 2.2 Classification des formes solides à libération contrôlée. A) Système membranaire, B) système matriciel et C) système hybride.

2.2 Systèmes matriciels hydrophiles

Les systèmes matriciels à base de polymères hydrophiles, aussi connus sous le nom de matrice gonflante ou de matrice gélifiante, sont la principale forme solide utilisée pour le contrôle de la libération des médicaments par voie orale (Chopra, Patil et Motwani, 2007 ; Colombo *et al.*, 2000 ; Siepmann et Peppas, 2000, 2001 ; Tiwari et Rajabi-Siahboomi, 2008 ; Wen et Park, 2010b). De l'ensemble des polymères hydrophiles disponibles commercialement pour l'élaboration des systèmes matriciels à libération contrôlée, les alginates sodiques, les amidons prégélatinisés, les dérivés de cellulose (méthylcellulose, hydroxypropylméthyl cellulose) et les polyéthylène oxydes sont parmi les excipients les plus couramment et abondamment utilisés (Cao *et al.*, 2005 ; Te Wierik *et al.*, 1997 ; Wen, Nokhodchi et Rajabi-Siahboomi, 2010). Les raisons expliquant la grande popularité des systèmes matriciels et des polymères hydrophiles sont leur facilité d'utilisation, leur faible coût, leur acceptabilité par les patients, leur flexibilité pour obtenir le profil de libération désiré et leur modulation précise de la libération des PA dans les fluides physiologiques (Chopra, Patil et Motwani, 2007). Les deux derniers avantages reliés à l'utilisation des polymères hydrophiles dans l'élaboration des formes solides à libération contrôlée dépendent de la solide compréhension des mécanismes sous-jacents à la libération des PA et des facteurs affectant ces mécanismes bien que l'architecture moléculaire de ces polymères peut être conçu pour donner une réponse bien définie à des conditions extérieures (Liechty *et al.*, 2010).

2.2.1 Libération des médicaments

La libération des PA à partir des systèmes matriciels hydrophiles est un processus dynamique (dans le temps et l'espace) qui implique des mécanismes de dissolution, de diffusion, de gonflement et d'érosion, tous gouvernés par l'hydratation de la matrice par les fluides du TGI.

Lors du contact initial de la matrice avec le fluide environnant, les chaînes de polymères à la surface de la matrice s'hydratent et se gélifient (gonflent) due à la modification des forces stabilisatrices de leur structure par les molécules d'eau. Spécifiquement, les molécules d'eau

agissent comme un agent plastifiant sur les chaînes de polymères réduisant ainsi leur température de transition vitreuse (t_g) facilitant le passage d'un état vitreux à un état caoutchouteux lorsque la valeur de t_g est égale à la température du système (Siepmann et Peppas, 2000). Ce phénomène correspond à la relaxation des chaînes de polymères. Au même moment, l'hydratation de la matrice permet la dissolution des particules de PA dispersées dans la couche de gel. Le taux de dissolution des PA par unité de temps (dm/dt) est décrit par l'équation de Noyes et Whitney (Wang et Schmeis, 2010) :

$$\frac{dm}{dt} = A \times \frac{D}{h} (C_s - C_b) \quad (2.1)$$

où A est la surface de dissolution, D le coefficient de diffusion, h est l'épaisseur de la couche de diffusion à la surface des particules, C_s est la solubilité du PA et C_b est la concentration de PA dans le fluide environnant.

Lors du contact initial de la matrice avec le fluide environnant, le front d'hydratation pénètre plus rapidement dans la matrice que le taux de gélification des chaînes de polymères ce qui entraîne une rapide formation de la couche de gel à la surface de la matrice (Colombo *et al.*, 2000). Toutefois, cette pénétration rapide du front d'hydratation permet la dissolution d'une plus grande quantité de PA qui peut être rapidement libéré de la matrice, dû au gradient de concentration, avant la formation de la couche de gel qui contrôle la libération des PA. Ce phénomène se nomme l'effet de décharge (*burst effect*) (Huang et Brazel, 2001).

Lorsque la couche de gel est établie, celle-ci contrôle la pénétration du fluide à l'intérieur de la matrice où il est possible de distinguer trois différents fronts, chacun correspondant à une position limite de changement de conditions physiques des chaînes de polymères. Ces fronts sont, de l'extérieur vers l'intérieur de la matrice : le front d'érosion, le front de diffusion et le front de gonflement (figure 2.3). Le front de gonflement ou le front d'hydratation se situe à la limite entre les chaînes de polymères partiellement hydratées et celles non hydratées. Le front d'érosion se situe à la surface du système matriciel. L'épaisseur de la couche de gel contrôlant la libération des PA est définie par la distance entre le front d'érosion et le front de gonflement (Colombo *et al.*, 2000). Au front d'érosion, les chaînes de polymères sont

totalelement hydratées ce qui entraîne leur solubilisation dans les cas où les chaînes ne sont pas réticulées (Wen et Park, 2010b). Cette couche de gel est continuellement remplacée par l'hydratation, ce qui permet à la matrice de continuer de gonfler jusqu'à l'hydratation complète de celle-ci. Le front de diffusion se termine à la limite où il y encore présence de particules de PA non dissous dans la couche de gel. À partir du front de diffusion, le transport des PA est contrôlé en partie par la seconde loi de Fick (Liechty *et al.*, 2010) :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (2.2)$$

où C est la concentration de PA, D est le coefficient de diffusion du PA dans la matrice gélifiée, t est le temps et x est la position.

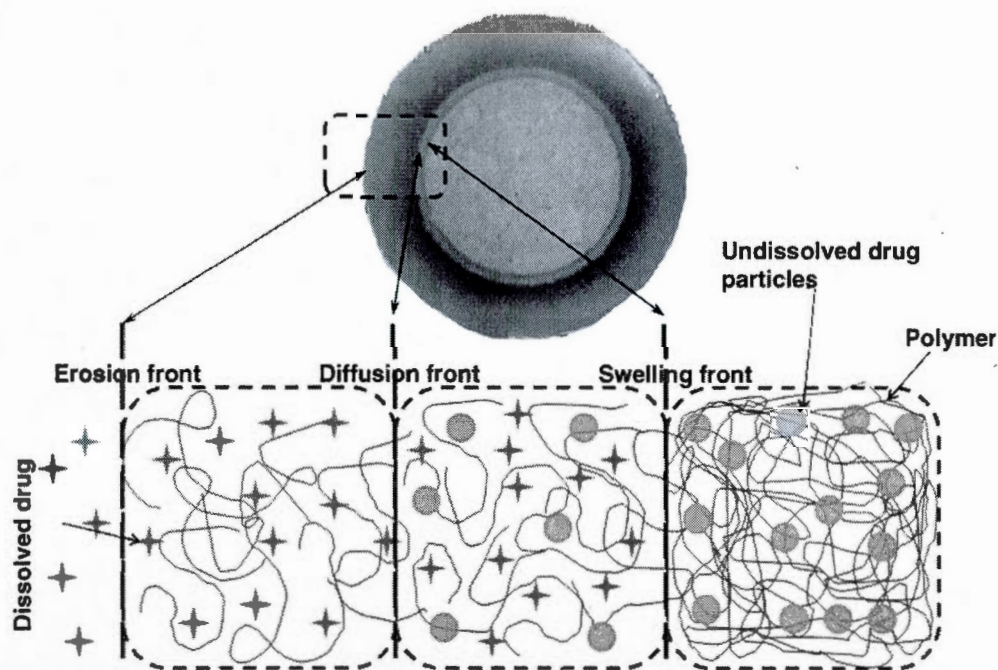


Figure 2.3 Représentation schématique de la position des différents fronts à l'intérieur d'un système matriciel hydrophile hydraté (Wen, Nokhodchi et Rajabi-Siahboomi, 2010)

À cette contribution au transport des PA par la diffusion, il se doit d'ajouter une contribution au transport des PA par le gonflement physique de la matrice ainsi qu'une contribution due à l'érosion de la matrice qui modifient dynamiquement la position des différents fronts à l'intérieur de la matrice (Siepmann et Peppas, 2000 ; Wen et Park, 2010b). Étant donnée cette dynamique, il est difficile d'émettre un modèle mathématique qui définira sur des fondements physiques la libération des PA à partir des systèmes matriciels hydrophiles (Siepmann et Peppas, 2000). C'est pourquoi de nombreux modèles semi-empiriques ont été émis afin de caractériser les contributions de la diffusion, du gonflement et de l'érosion sur la cinétique de libération des PA à partir de ces systèmes matriciels hydrophiles. Ces modèles sont discutés dans la section 2.2.2.

En résumé, les mécanismes de libération des PA, à partir des systèmes matriciels qui définiront conséquemment des cinétiques de libération des PA, dépendent de la formation de la couche de gel, de sa dynamique, de son épaisseur et de son maintien dans les fluides environnants. De plus, à l'intérieur de cette couche de gel, la libération des PA peut être contrôlée par la diffusion du PA dans celle-ci, par le gonflement et par l'érosion de la matrice. Les facteurs influençant la libération des PA à partir des systèmes matriciels hydrophiles seront discutés dans la section 2.2.3.

2.2.2 Caractérisation des cinétiques de libération et modélisation des mécanismes de libération des médicaments

Les tests de dissolution sont les méthodes les plus communes utilisées pour caractériser *in vitro* les cinétiques de libération des PA à partir des formes pharmaceutiques solides (Dyas et Shah, 2007). Ces tests consistent à placer la forme solide dans une cellule contenant un volume préétabli de milieu de dissolution maintenu à une température donnée (usuellement 37 °C) et de quantifier dans le temps, au moyen d'une méthode appropriée (spectroscopie UV, chromatographie liquide à haute performance), l'augmentation de concentration du PA dans le milieu de dissolution. Les caractéristiques des appareils servant à réaliser les tests de dissolutions sont définies dans la pharmacopée américaine (US Pharmacopeial Convention, 2012). La sélection du milieu de dissolution est une étape fondamentale du test de dissolution (Dyas et Shah, 2007). Idéalement, le milieu de dissolution devrait être formulé pour

correspondre le plus près possible aux différents fluides et conditions physiologiques se retrouvant dans le TGI. Parmi ces milieux de dissolution, la pharmacopée américaine définit un milieu pour représenter les conditions gastriques, le fluide gastrique simulé (FGS, pH 1,2) et un milieu pour représenter les conditions intestinales, le fluide intestinal simulé sans (FIS, pH 6,8) ou avec des enzymes pancréatiques (FIS_{Pan}).

L'obtention des profils de dissolution des PA à partir des formes solides permet, en premier lieu, de caractériser le temps nécessaire pour la libération d'une quantité donnée de PA et, en second lieu, d'utiliser lesdits profils de dissolution pour comparer les formulations les unes par rapport aux autres (Costa et Sousa Lobo, 2001). Les profils de dissolution permettent également, dans une certaine mesure, de caractériser les mécanismes de libération des PA. Cette caractérisation s'effectue au moyen de modèles semi-empiriques dont les paramètres de modélisation sont obtenus par l'ajustement du modèle sélectionné sur le profil au moyen de régression (linéaire ou non linéaire). En effet, il existe une multitude de modèles semi-empiriques qui peuvent être utilisés pour caractériser les mécanismes de libération. L'auteur de cette thèse invite les lecteurs à consulter les publications de Costa et Sousa Lobo (2001), de Kanjickal et Lopina (2004), de Narasimhan (2001) et de Siepmann *et al.* (2001 ; 2001) pour la description complète et détaillée des nombreux modèles disponibles ainsi que leurs critères de validité. Particulièrement, les modèles de Ritger et Peppas (1987) et de Peppas et Sahlin (1989) qui sont couramment utilisés pour l'étude des mécanismes de libération des PA (Wang et Schmeis, 2010).

Le modèle de Ritger et Peppas (1987) correspond à :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (2.3)$$

où M_t/M_∞ est la fraction de PA libéré au temps t, k est une constante cinétique représentant la vitesse de libération et n est l'exposant de libération qui est indicatif du mécanisme de transport. Les valeurs limites de n dépendent des caractéristiques géométriques de la forme solide et sont fournis dans le tableau 2.1 pour le cas des formes solides cylindriques.

Le modèle de Peppas et Sahlin (1989) correspond à :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{(2m)} \quad (2.4)$$

où k_1 et k_2 sont des constantes cinétiques et m est l'exposant de libération purement Fickienne. Le terme de droite de l'équation (2.4) représente la contribution de la diffusion Fickienne et le terme de gauche, la contribution de la relaxation/érosion du polymère. La valeur de m est également dépendante des caractéristiques géométriques de la forme solide et peut être déterminée selon la figure 2.4 pour une forme cylindrique.

Tableau 2.1 Mécanismes (types de transport) associés à la valeur de l'exposant de libération n du modèle de Ritger et Peppas (1987) pour une forme cylindrique

Exposant de libération (n)	Mécanisme
0,45	Diffusion
$0,45 < n < 0,89$	Combinaison de la diffusion et de la relaxation du polymère (<i>anomalous transport</i>)
0,89	relaxation du polymère (Gonflement/érosion)

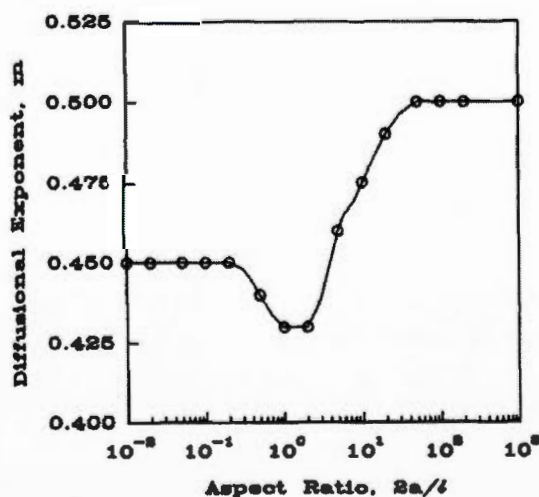


Figure 2.4 Variation de l'exposant de libération purement Fickienne (m) du modèle de Peppas et Sahlin (1989) selon le ration $2a/l$ ($2a$ est le diamètre et l est l'épaisseur du comprimé monolitique).

2.2.3 Propriétés physico-chimiques et considérations biopharmaceutiques influençant la libération des PA.

Les propriétés de contrôle de la libération des PA par les systèmes matriciels hydrophiles peuvent être adaptées par les propriétés physico-chimiques des polymères (masse moléculaire, structure, flexibilité des chaînes, taille et distribution de taille de particules, porosité, solubilité, t_g , ionicité), les propriétés physico-chimiques des PA (masse moléculaire, solubilité, taille et distribution de taille de particules, morphologie des particules), les interactions entre les chaînes des polymères hydratés et avec les PA (ionicité) et les propriétés des systèmes matriciels (géométrie, dimensions physiques, masse, porosité, teneur en PA) (Chopra, Patil et Motwani, 2007 ; Colombo *et al.*, 2000 ; Gupta, Vermani et Garg, 2002 ; Huang et Brazel, 2001 ; Huang, Yu et Xiao, 2007 ; Liechty *et al.*, 2010 ; Ranade et Hollinger, 2004 ; Saltzman, 2001 ; Wang, Siahaan et Soltero, 2005). Tous ces facteurs sont en interdépendances entre eux et avec l'ensemble des différentes conditions physiologiques se retrouvant dans les fluides physiologiques du TGI (section 1.2 et figure 1.11), dont la valeur de pH, les enzymes et les temps de résidence dans les différentes régions du TGI sont les facteurs les plus importants (Chien et Lin, 2007 ; Shargel et Yu, 2007 ; Zhang et Surian, 2010). De plus, l'interdépendance entre ces facteurs est plus que souvent de nature combinatoire et non linéaire.

Un facteur physico-chimique particulièrement intéressant dans le cadre de cette recherche influençant les propriétés de libération de PA à partir des systèmes matriciels hydrophiles est le caractère ionique des polymères. En effet, pour un polymère non ionique la capacité de gonflement dépend uniquement de la composition chimique du polymère tandis que pour un polymère ionique, la capacité de gonflement dépend également du pH du milieu environnant (figure 2.5a). Dans un milieu au-dessus de sa valeur de pKa, les groupes ionisables sur la chaînes d'un polymère anionique se déprotonnent, ce qui ainsi accentue son gonflement. À l'opposé, les polymères cationiques gonfleront plus significativement dans un milieu au-dessous de leur valeur de pKa dû à la protonation de leurs groupes ionisables. Cette dépendance au pH du milieu environnant des matrices hydrophiles ioniques est illustrée dans la figure 2.5b. La dépendance au pH du gonflement des matrices hydrophiles ioniques est également reliée à la force ionique du milieu environnant (Huang, Yu et Xiao, 2007).

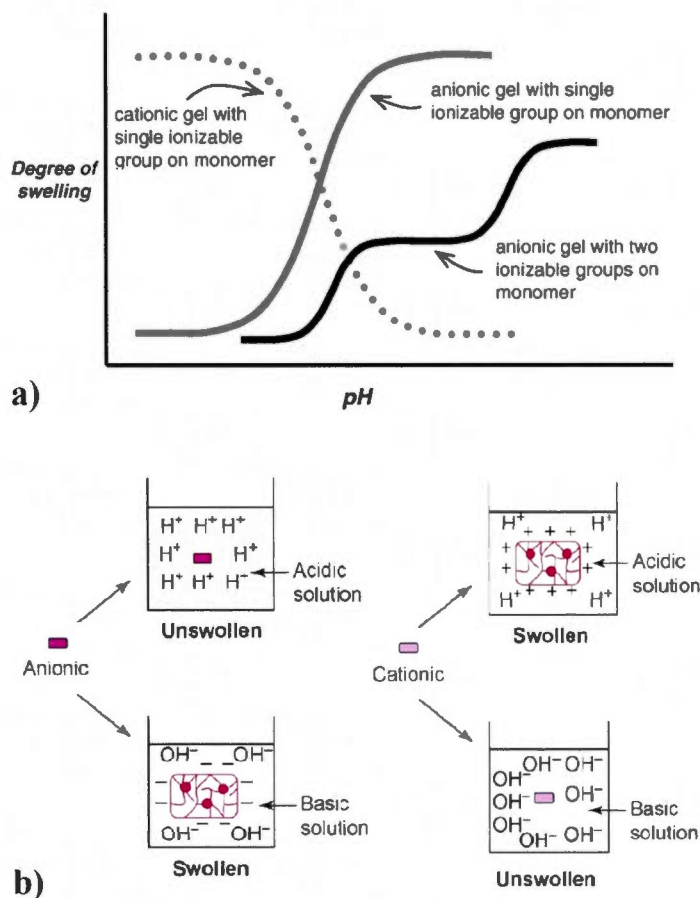


Figure 2.5 Représentation schématique de la capacité de gonflement des polymères hydrophiles ioniques. a) Gonflement des polymères hydrophiles ioniques en fonction de la valeur du pH et du nombre de groupes ionisables (Lin et Metters, 2006) et b) gonflement des systèmes matricielles hydrophiles en fonction du pH du milieu environnant (adapté de Gupta, Vermani et Garg, 2002).

En fait, tous les facteurs physico-chimiques et physiologiques mentionnés ci-dessus affectent d'une façon ou d'une autre la formation ou la structure de la couche de gel à la surface des matrices et en conséquence, les mécanismes qui contrôleront la libération des PA (Colombo *et al.*, 2000). Ces facteurs doivent être également considérés dans la perspective que l'élaboration des systèmes matriciels pour l'administration contrôlée par voie orale des médicaments doit avoir pour objectifs de permettre l'absorption d'une quantité suffisante de PA selon un taux optimal afin d'obtenir le profil pharmacocinétique désiré pour assurer

l'efficacité thérapeutique desdites formes solides (Uchizono, 2010). Ainsi, l'efficacité d'une forme pharmaceutique solide n'est pas seulement dépendante des propriétés thérapeutiques du PA, mais aussi des excipients avec laquelle elle est formulée ainsi que des procédés utilisés. (Pifferi, Santoro et Pedrani, 1999).

Cette interdépendance des propriétés de libération des PA à partir des systèmes matriciels hydrophiles et des propriétés biopharmaceutiques des PA est bien illustrée par les formes solides gastro-rétentives élaborées afin d'accroître leur temps de résidence dans l'estomac humain au-delà des valeurs normales de temps associé avec le processus normal de digestion (tableau 1.1). Les formes gastro-rétentives sont classifiées selon les concepts physiques qu'elles utilisent afin d'accroître leur temps de résidence gastrique soit, les systèmes à haute densité, les systèmes à taux de gonflement élevé, les systèmes mucoadhésifs et les systèmes flottants (figure 2.6b) (Bardonnet *et al.*, 2006 ; Talukder et Fassihi, 2004). Ces derniers systèmes étant les formes les plus répandues pour les applications de gastro-rétention (Pawar *et al.*, 2011 ; Zaware *et al.*, 2010). De plus, les principales formes solides utilisées pour les applications gastro-retentives sont, de nouveau, les systèmes matriciels hydrophiles (Moës, 1993 ; Vasir, Tambwekar et Garg, 2003).

Ces systèmes gastro-rétentifs trouvent leur utilité dans les cas où 1) les PA possèdent une action thérapeutique localisée dans l'estomac ou une fenêtre d'absorption réduite dans les premières parties de l'intestin grêle (figure 2.6b); 2) les PA sont sensibles aux enzymes présentes dans la lumière de l'intestin; 3) les PA présentent une faible solubilité en milieu neutre ou encore, 4) les PA sont substrat des P-gp (Davis, 2005 ; Talukder et Fassihi, 2004). Ainsi, par l'élaboration d'un système gastro-rétentif à partir d'un polymère hydrophile possédant les caractéristiques physico-chimiques appropriées, il est possible de libérer les PA dans l'estomac pour ultimement augmenter leur biodisponibilité et leur efficacité thérapeutique.

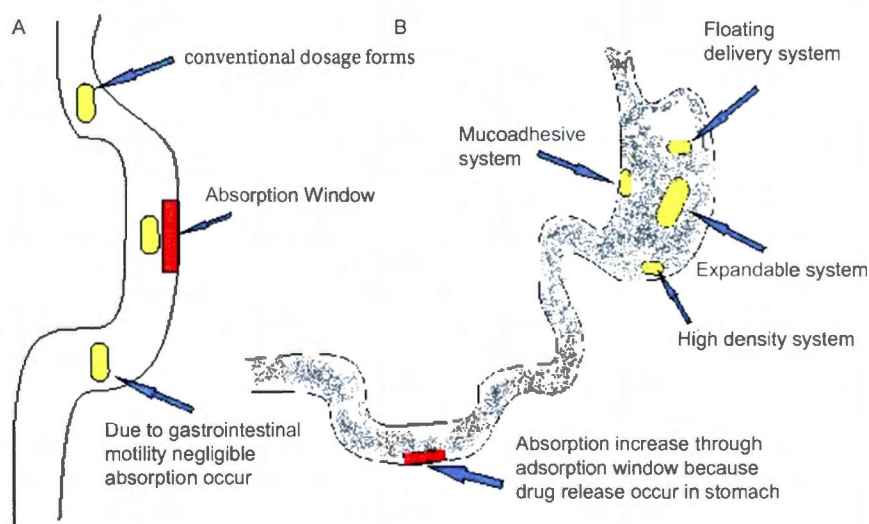


Figure 2.6 PA avec fenêtre d'absorption limitée. A) Absorption avec forme solide classique et B) les différentes formes solides gastro-rétentives (Pawar *et al.*, 2011).

2.3 Les formes solides mucoadhésives

Les formes solides mucoadhésives sont une catégorie particulière des systèmes à libération contrôlée. Ces formes exploitent les propriétés mucoadhésives (*i.e.* d'adhésion à la surface des couches de mucus superficielles des muqueuses du TGI, section 1.2) des excipients polymériques avec lesquels elles sont formulées dans le but premier d'accroître le temps de résidence desdites formes dans une région spécifique du TGI (Andrews, Laverty et Jones, 2009).

2.3.1 La mucoadhésion

La mucoadhésion est un phénomène complexe et de nombreuses théories ont été proposées pour expliquer les mécanismes impliqués lors de ce phénomène. Ces théories se distinguent sur les bases physiques sur lesquelles elles reposent : la théorie électronique, la théorie du mouillage, la théorie de rupture, la théorie d'adsorption et la théorie de diffusion-verrouillage (Smart, 2005). En réalité, les mécanismes impliqués dans la mucoadhésion sont un ensemble de toutes ces théories (Andrews, Laverty et Jones, 2009 ; Dodou, Breedveld et Wieringa, 2005).

La mucoadhésion peut se décrire en deux étapes (figure 2.7). L'étape de contact entre la forme mucoadhésive et la couche de mucus, suivie de l'étape de consolidation où les différentes interactions physico-chimiques se produisent pour consolider et renforcer les joints adhésifs (Smart, 2005). Lors de l'étape de consolidation, les interactions physico-chimiques sont l'interpénétration physique des chaînes et des glycoprotéines du mucus qui peuvent former des interactions associatives, soit des liaisons covalentes, des liaisons ioniques, des ponts hydrogènes ou Van der Waals (figure 2.8).

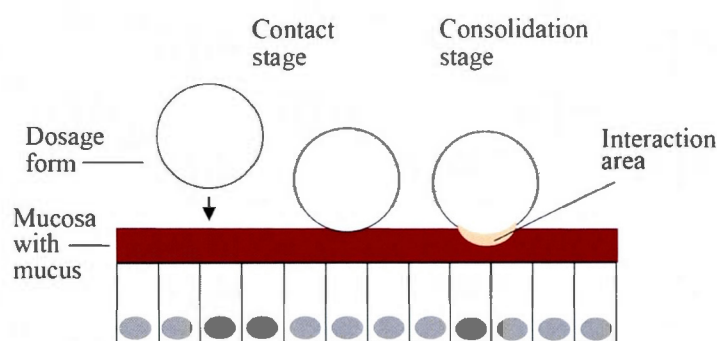


Figure 2.7 Les deux étapes dans la mucoadhésion (Smart, 2005).

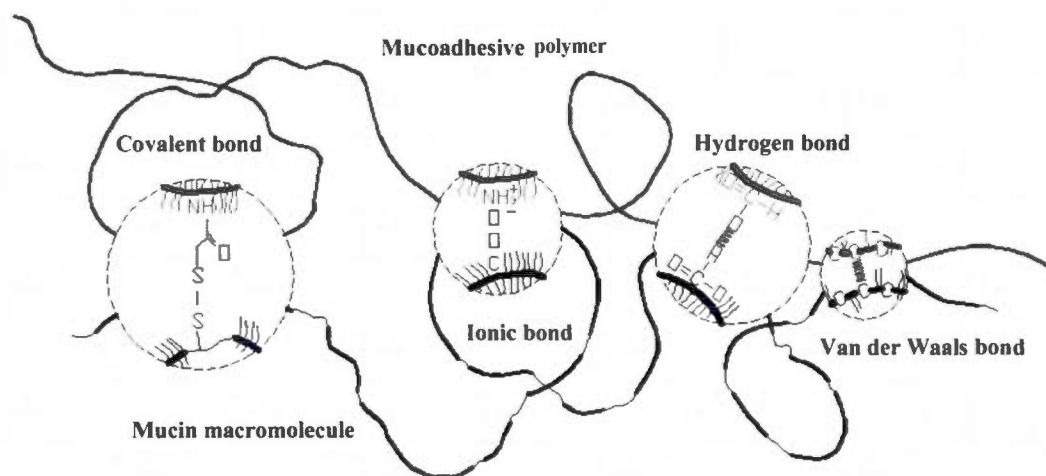


Figure 2.8 Interactions associatives entre les glycoprotéines du mucus (mucine) et les polymères mucoadhésifs (adapté de Dodou, Breedveld et Wieringa, 2005).

2.3.2 Excipients mucoadhésifs

Les polymères qui ont été le plus largement étudiés comme excipient mucoadhésif sont les macromolécules hydrophiles possédant de nombreux groupes qui permettent la formation de ponts hydrogènes (Harding *et al.*, 1999 ; Peppas, Thomas et McGinty, 2009 ; Smart, 2005). Ces études soulignent également que les excipients mucoadhésifs doivent être capables de former des hydrogels. Les hydrogels sont des réseaux de polymères qui absorbent de grandes quantités d'eau tout en restant insolubles dans des solutions aqueuses, due à la réticulation chimique ou physique des chaînes de polymères (Lin et Metters, 2006). La mucoadhésivité des excipients est interdépendante de la nature intrinsèque du polymère (masse moléculaire, flexibilité des chaînes, conformation spatiale, capacité de gonflement et polarité), des propriétés de la forme solide (taille, forme, surface, densité, PA et teneur de PA), de la nature de l'environnement (pH, force ou cisaillement appliqué, le temps de contact initial et la température) et de la nature de la couche de mucus (charge à la surface, densité, viscosité et taux de renouvellement de la couche) (Ahuja, Khar et Ali, 1997 ; Andrews, Lavery et Jones, 2009 ; Dodou, Breedveld et Wieringa, 2005). Afin d'être utilisé comme un excipient mucoadhésif, le polymère devrait répondre aux critères particuliers suivants (Junginger et Verhoef, 2007) :

- Adhésivité avec la couche de mucus afin d'offrir un contact adéquat;
- La capacité de gonfler et de permettre la libération du PA;
- La capacité de prolonger le temps de résidence de la forme au site d'absorption désiré;
- Biocompatible avec la muqueuse afin d'éviter toute cytotoxicité ou autre altération permanente de la muqueuse;
- Biodégradable afin de permettre sa disposition à la surface de la muqueuse.

Plusieurs excipients répondent à ces critères et ont été utilisés pour l'élaboration de formes mucoadhésives, tels que le chitosan, les polymères d'acides méthacryliques, le carboxyméthyl cellulose sodique et hydroxyméthyl cellulose (Andrews, Lavery et Jones, 2009).

2.3.3 Microsphères mucoadhésives

Les microsphères mucoadhésives élaborées à partir de polymères hydrophiles présentent de nombreux avantages pour l'administration orale des PA. En effet, les microsphères, en tant que système multiparticulaire, ont la tendance à être dispersés dans le TGI (figure 2.9) assurant un profil de libération plus fiable et plus reproductible et donc, une absorption des PA plus uniforme (Asghar et Chandran, 2006). Les microsphères mucoadhésives de moins de 600 μm peuvent pénétrer profondément la couche de mucus et y être solidement maintenues mais, puisque le mucus est continuellement sécrété, les particules seront détachées de la muqueuse pour être finalement éliminées par le transit du TGI (Ponchel et Irache, 1998 ; Washington, Washington et Wilson, 2001) (figure 2.9). Ainsi, les microsphères mucoadhésives, due à leur rapport de surface sur volume élevé et à un contact intime avec la couche de mucus, peuvent améliorer l'absorption des PA et prolonger leur temps de résidence permettant ainsi d'augmenter la biodisponibilité des PA pour des actions thérapeutiques ciblées ou systémiques (Vasir, Tambwekar et Garg, 2003). Il a été également montré que les interactions de certaines microsphères mucoadhésives avec les barrières épithéliales du TGI pouvaient entraîner une ouverture réversible des jonctions serrées ce qui augmentait par le fait même, le taux d'absorption paracellulaire des PA (Chowdary et Srinivasa Rao, 2004). Un dernier avantage non négligeable des microsphères mucoadhésives hydrophiles est qu'il est possible d'adapter leurs propriétés afin qu'elles adhèrent à toutes les muqueuses humaines, dont celles du TGI (Chowdary et Srinivasa Rao, 2004 ; Vasir, Tambwekar et Garg, 2003).

À la meilleure connaissance de l'auteur de cette thèse, il n'existe pas de méthode standardisée pour quantifier de façon absolue la mucoadhésion des microsphères sur les muqueuses. Toutefois, des méthodes sont décrites dans la littérature pour caractériser les propriétés extensives de mucoadhésion des microsphères (Chowdary et Srinivasa Rao, 2004 ; 2003 ; Davidovich-Pinhas et Bianco-Peled, 2010 ; Mortazavi, 1995 a ; 1995 b ; Perioli *et al.*, 2004a ; 2004b), de façon générale, ces méthodes correspondent à la caractérisation *in vitro* de la dynamique de résistance des microsphères, préalablement appliquées sur des muqueuses artificielles ou prélevées du TGI d'animaux, à un cisaillement par un fluide sous des conditions représentatives de la muqueuse étudiée (gastrique ou intestinale).

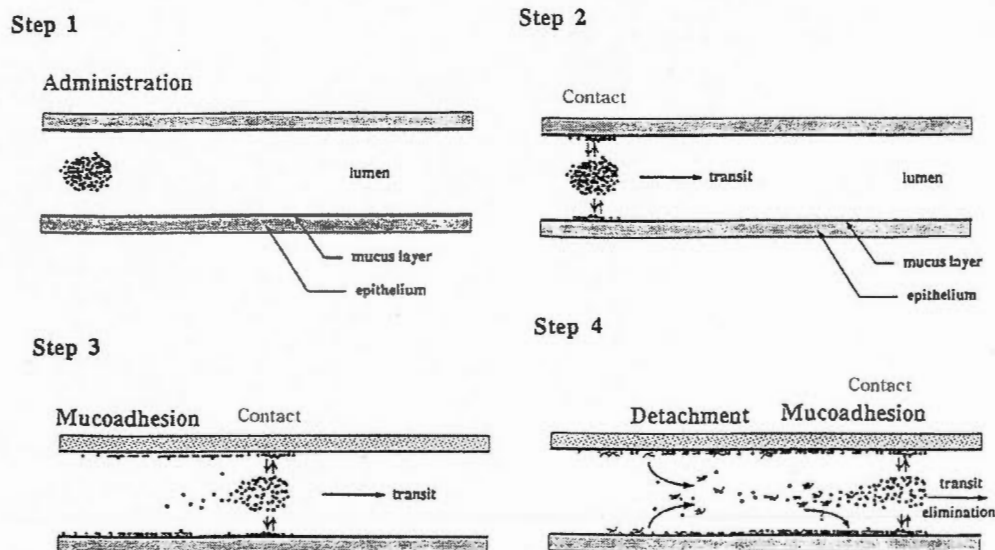


Figure 2.9 Dispersion des microsphères mucoadhésives dans le TGI suivant leur administration orale (adapté de Ponchel et Irache, 1998).

2.4 Excipients pharmaceutiques multifonctionnels

Il a été discuté dans l'introduction que l'industrie pharmaceutique possédait un intérêt de premier plan pour les excipients multifonctionnels puisqu'ils permettent de réduire les risques potentiels d'incompatibilité entre les excipients et les PA par la réduction du nombre d'excipients nécessaires dans les formulations solides (équation 1). De plus, ces excipients multifonctionnels procurent de nombreux avantages sur les plans économiques et de productivité associés à la production des formes solides à l'échelle industrielle (tableau 2.2). Il n'existe pas actuellement de consensus globalement accepté dans l'industrie pharmaceutique pour distinguer un excipient multifonctionnel d'un excipient fonctionnel traditionnel (Rios, 2006). Une raison expliquant ce manque de consensus est que les fonctionnalités des excipients se définissent toujours pour une formulation donnée et chaque formulation a ses propres exigences particulières pour les fonctionnalités (Moreton, 2010a). Toutefois, Rios (2006) propose, afin de définir un excipient comme étant un excipient multifonctionnel, s'il peut répondre à quatre critères:

- L'excipient doit combiner deux ou plusieurs fonctions traditionnellement accomplies par un seul excipient tels que d'agent de glissement, d'agent de remplissage, de lubrifiant, d'antiadhérant, de liant et/ou de désintégrant;
- L'excipient doit avoir de hautes performances de production inhérente même à de faibles concentrations dans la formulation telle que de permettre d'augmenter la taille des lots et de charger de haute teneur de PA;
- L'excipient ne doit recourir à aucun procédé complexe pour son utilisation, faisant de celui-ci un excipient idéal pour le procédé de compression directe;
- L'excipient doit transmettre ces hautes caractéristiques de performances fonctionnelles à l'ensemble de la formulation.

De plus, dans le cadre du développement d'un nouvel excipient multifonctionnel, les caractéristiques de celui-ci doivent, dans la mesure du possible, correspondre aux caractéristiques d'un excipient idéal (tableau 2.3). Parmi les excipients qui sont reconnus comme étant multifonctionnels, mentionnons les polymères d'acide méthacrylique (Eudragit® RL et RS, Evonik), les polyvinyl pyrrolidone réticulés (Kollidon® CL, CL-F, CL-SF, CL-M, BASF), les carboxyméthyl cellulose (Aqualon®, Ashland) et l'amidon partiellement prégélatinisé (Starch 1500®, Colorcon) (Deorkar et Baker, 2008).

Tableau 2.2 Avantages économiques et de productivité avec l'utilisation des excipients multifonctionnels (adapté de Seufert et Zeleznik, 2009).

Avantages de formulation	
<ul style="list-style-type: none"> • Vitesse <ul style="list-style-type: none"> ○ Développement rapide des formulations ○ Plus rapidement aux essais cliniques ○ Commercialisation plus rapide • Stabilité 	
Efficacité de production	
<ul style="list-style-type: none"> • Conversion à moindre coût vers la compression directe • Moins d'excipients <ul style="list-style-type: none"> ○ Coûts des matières premières inférieures ○ Taille de lot supérieure ○ Moins de tests analytiques • Mise à l'échelle facilitée • Production plus rapide • Réduction du temps de cycle de production • Moins de perte au cours de la production • Moins de produits hors normes • Meilleure utilisation des équipements • Moins de maintenance des équipements 	
Conditionnement	
<ul style="list-style-type: none"> • Réduction des coûts de conditionnement et de manutention 	
Marketing	
<ul style="list-style-type: none"> • Différenciation du produit 	
Nettoyage	
<ul style="list-style-type: none"> • Moins de frais de nettoyage et problèmes environnementaux 	
Inventaire	
<ul style="list-style-type: none"> • Moins d'entreposage d'excipient • Coûts d'inventaire réduit 	
Assurance de qualité / contrôle de la qualité	
<ul style="list-style-type: none"> • Moins de coûts par rapport à l'utilisation classiques de multiples excipients et de procédés multi-étapes 	

Tableau 2.3 Caractéristiques d'un excipient idéal (adapté de Pifferi, Santoro et Pedrani, 1999)

-
- Phamaco-toxicologiquement inactif,
 - Chimiquement et physiquement inerte vs. le médicament,
 - Compatible avec les autres excipients,
 - Sans couleur (blanc) et sans goût,
 - Haute fluidité ou bonne propriété d'écoulement,
 - Haute compressibilité,
 - Disponible internationalement auprès de plusieurs fournisseurs,
 - Faible coût d'acquisition,
 - Bien caractérisé par les fournisseurs,
 - Propriétés reproductibles de lot en lot,
 - Performance uniforme avec la forme pharmaceutique spécifique.
-

CHAPITRE III

CARBOXYMÉTHYL AMIDON : EXCIPIENT PHARMACEUTIQUE

3.1 L'amidon

L'amidon est l'un des polysaccharides végétaux les plus abondants sur terre et a pour fonction d'emmagasinier chimiquement l'énergie solaire convertie lors de la photosynthèse (Daniel *et al.*, 2007 ; Zobel et Stephen, 1995). L'amidon est aussi la principale source de glucides et de calories, de l'ordre de 60 à 70%, dans l'alimentation humaine (Robyt, 2008). Au-delà de cette importance de l'amidon dans l'alimentation quotidienne, la consommation d'une grande quantité d'amidon a même été un facteur évolutif chez les populations humaines (Perry *et al.*, 2007 ; Robyt, 2008). Il est alors facile de comprendre pourquoi, encore à ce jour, les applications industrielles principales des amidons se retrouvent dans l'industrie alimentaire (ex. : agent épaississant, stabilisant) (Wanous, 2004). Toutefois, les amidons possèdent également de nombreuses caractéristiques chimiques et physiques distinctes qui élargissent leurs champs d'applications dans plusieurs autres industries, dont celles : des pâtes et papiers (ex. agent floculant, de rétention, d'adhésion) (Maurer et Kearney, 1998), des textiles (ex. agent épaississant, d'adhésion) (Moore, 1967), de l'énergie (Zhang *et al.*, 2007) et pharmaceutique tel que précédemment mentionné (voir Introduction). Afin de réaliser ces différentes applications, il est estimé que la production industrielle mondiale d'amidon en 2010 était de 70 millions de tonnes et serait supérieure à 75 millions de tonnes en 2012 (Market research News, 2010).

3.1.1 Molécules d'amidon et voies de synthèse

Contrairement aux glucides et autres polymères comestibles, l'amidon natif se retrouve sous forme de particules discrètes, appelées granules d'amidon, dans les chloroplastes des feuilles et des amyloplastes des organes d'emmagasiner des végétaux tels que les graines et les tubercules (Daniel *et al.*, 2007 ; Wang, Bogracheva et Hedley, 1998). Les granules d'amidon sont composés de deux différents types de polymères, l'amylose et l'amylopectine. L'amylose (figure 3.1a), un polymère qualifié de non-ramifié, est composée de 200 à 2000 molécules de glucopyranoses (GU) liées entre elles par des liaisons $\alpha(1-4)$ (Wurzburg, 1986). Toutefois, il est maintenant bien établi que l'amylose « linéaire » possède un faible niveau de ramification, liaison $\alpha(1-6)$ et à une occurrence d'une ramification approximativement à tous les 170 à 500 GU (Preiss, 2004). L'amylopectine (figure 3.1b) est un polymère hautement ramifié de poids moléculaire élevé (jusqu'à 3×10^6 GU) organisé de séquences linéaires, liaisons $\alpha(1-4)$, de 20 à 30 GU liés par des liaisons $\alpha(1-6)$ aux points de branchement (Wurzburg, 1986). En général, les granules d'amidon sont composés de 20 à 30% d'amylose et de 70 à 80% d'amylopectine, mais en fonction de la source des granules d'amidon (par exemple maïs, pomme de terre, pois, tapioca), ce ratio d'amylose et d'amylopectine à l'intérieur des granules d'amidon peut grandement varier ce qui confère à chaque type d'amidon des propriétés uniques (Bertoft, 2004 ; Daniel *et al.*, 2007).

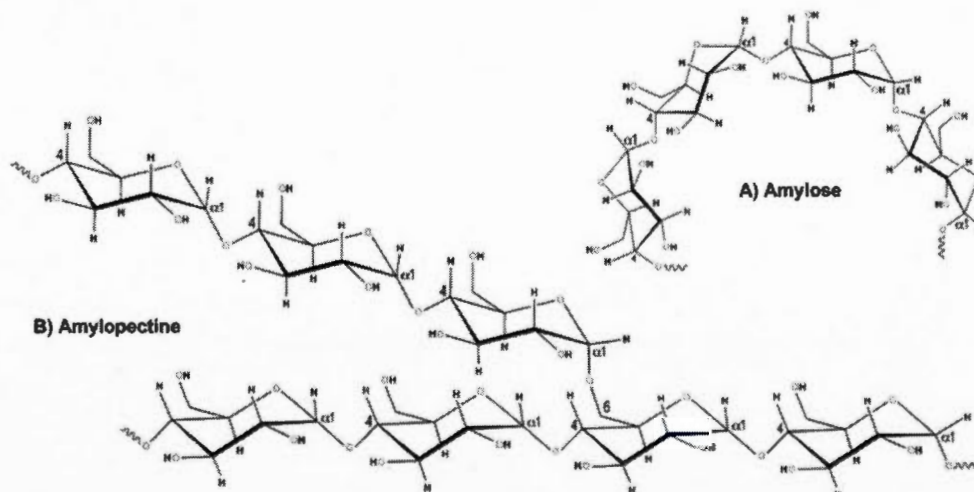


Figure 3.1 Structure chimique représentative de (A) l'amylose (liaison $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -glucose) et (B) l'amylopectine ramifiée (liaison linéaire $\alpha(1 \rightarrow 4)$ -glucose et liaison ramifiée $\alpha(1 \rightarrow 6)$ -glucose tous les 20 à 30 α -D-glucopyranose) (adapté de Helmberger, 2009).

Les voies biochimiques de synthèse des amidons sont présentées dans la figure 3.2. Les détails de ces voies biochimiques et des enzymes impliquées dans celles-ci ne seront pas abordés dans cette thèse, mais ils peuvent être consultés dans : Ball et Morell (2003), Erlander (Erlander, 1998a, 1998b), Kossmann et Lloyd Kossmann et Lloyd (2000), Martin et Smith (1995), Nelson et Pan Nelson et Pan (1995), Preiss (2004) et Smith *et al.* (1997). Il est toutefois possible de ressortir de ces publications que trois enzymes principales sont impliquées dans la synthèse de l'amidon soit l'ADP-glucose pyrophosphorylase (figure 3.2c), l'amidon synthétase (figure 3.2e) et l'enzyme de branchement de l'amidon (figure 3.2f). La première enzyme est responsable de la synthèse de l'unité d'adénosine diphosphate glucose (ADP-glucose) dans tous les tissus végétaux (Smith, Denyer et Martin, 1997). Les deux dernières sont responsables de la synthèse de l'amylose et de l'amylopectine, où leur activité relative peut varier selon le type de végétaux, les isoformes des enzymes présentes, leur spécificité et leur régulation temporelle (Wang, Bogracheva et Hedley, 1998). Ces caractéristiques expliquent pourquoi le ratio d'amylose et d'amylopectine à l'intérieur des granules d'amidon est spécifique à chaque source d'amidon. De plus, il est possible de modifier génétiquement l'expression de l'amidon synthétase et de l'enzyme de branchement de l'amidon chez certains végétaux pour produire des amidons avec des niveaux d'amyloses et d'amylopectines modifiés tels que, à titre d'exemple, des amidons de maïs riche en amylose (Hylon V : 50% amylose ou Hylon VII : 70% amylose) conférant à ces amidons des propriétés fonctionnelles inédites, uniques et standardisées (Shi *et al.*, 1998).

3.1.2 Structures des amidons

La chimie relativement simple des amidons ne reflète pas l'extrême complexité des structures finales des amidons (Bertoft, 2004). La figure 3.3 montre que les différentes structures des amidons s'étendent sur plusieurs niveaux, des granules d'amidon dans les plantes à la conformation des GU.

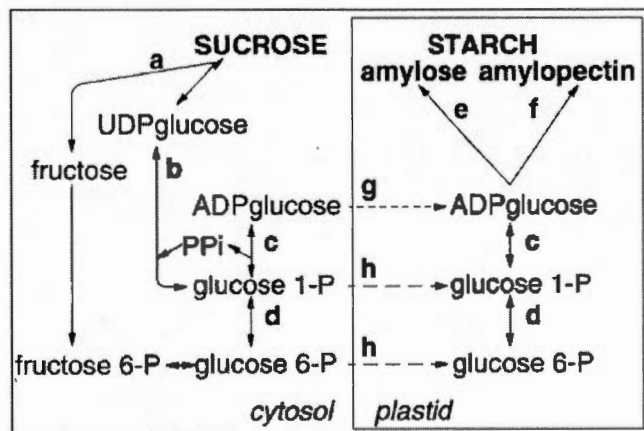


Figure 3.2 Biosynthèse de l'amidon. Voies biochimiques de la biosynthèse de l'amidon à partir du saccharose, les enzymes et les métabolites principaux impliqués dans la conversion du saccharose en amidon dans les tubercules. Le glucose entre dans le plaste soit sous forme de glucose-6-phosphate (glucose 6-P) ou sous forme d'adénosine diphosphate glucose (ADP-glucose). Les enzymes sont : (a) saccharose synthétase, (b) uracile diphosphate glucose (UDP-glucose) pyrophosphorylase, (c) ADP-glucose pyrophosphorylase, (d) phosphoglucomutase, (e) amidon synthétase, (f) enzyme de branchement de l'amidon, (g) transporteur de l'ADP-glucose, (h) transporteur du glucose 6-P. PPi : anion pyrophosphate (Smith, Denyer et Martin, 1997).

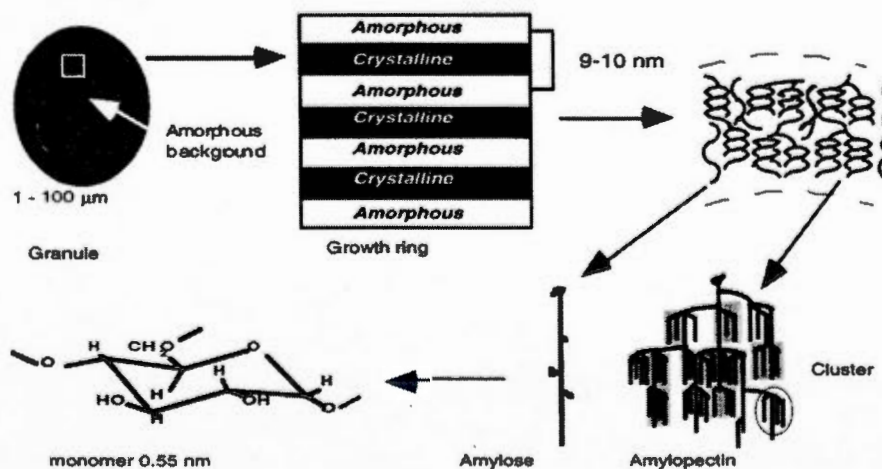


Figure 3.3 Représentation schématique des différents niveaux de structure des granules d'amidon et de l'implication de l'amylose et de l'amylopectine (adapté de Buléon *et al.*, 1998).

La structure des chaînes d'amidon a été élucidée en très grande partie par analyse des poudres par diffraction de rayons X (*X-ray powder diffraction*, XRPD) (Sarko et Wu, 1978). Tout comme le ratio d'amylose et d'amylopectine, la structure des amidons et des dérivés d'amidon, subséquemment discutés, détermine leurs propriétés physico-chimiques (Daniel *et al.*, 2007 ; Wang, Bogracheva et Hedley, 1998 ; Zobel, 1988b, 1988a). À l'état natif, les parties linéaires de l'amylopectine et l'amylose s'organisent en double hélices parallèles à enroulement sénestre (figure 3.4b). Cette hélice est composée de 6 GU par tour, de 2.13 nm de pas (Zobel, 1988b). La stabilisation de la conformation en doubles hélices est réalisée par des interactions du type ponts hydrogènes entre les groupes hydroxyles des GU. Les doubles hélices d'amidon forment des cristallites, disséminées à l'intérieur de régions amorphes, sous deux formes polymorphiques. Les structures polymorphiques des cristallites se distinguent selon deux schémas de maille élémentaire, monoclinique (structure de type-A) ou hexagonal (structure de type-B) (figure 3.4 c et d). L'amidon possède un troisième polymorphe, structure de type-C, qui est un amidon composé de cristallites de types-A et -B (Wang, Bogracheva et Hedley, 1998).

Les cristallites peuvent également adopter une autre structure polymorphique, soit la structure de type-V. La structure de type-V se caractérise par l'enroulement sénestre d'une simple chaîne d'amylose (figure 3.4a). Cette hélice est également composée de 6 UG par tour, mais de 0.805 nm de pas conférant une structure plus compacte aux chaînes d'amidon. Les structures de type-V suivent un schéma de maille élémentaire orthorhombique (Zobel, 1988b). La structure de type-V n'existe pas à l'état naturel, mais est le résultat d'une cristallisation rapide des chaînes ou de leur co-cristallisation avec des composés tels que l'iode, le diméthylsulfoxyde, les alcools ou les acides gras à la suite de la solubilisation des amidons natifs par gélatinisation (Buléon *et al.*, 1998). Ces composés, bien que permettant la formation de la structure de type-V, ne sont pas systématiquement inclus dans l'hélice d'amylose. Les amidons possédant une structure de type-V sont solubles dans l'eau à l'opposé des amidons possédant des structures de type-A ou -B (Daniel *et al.*, 2007).

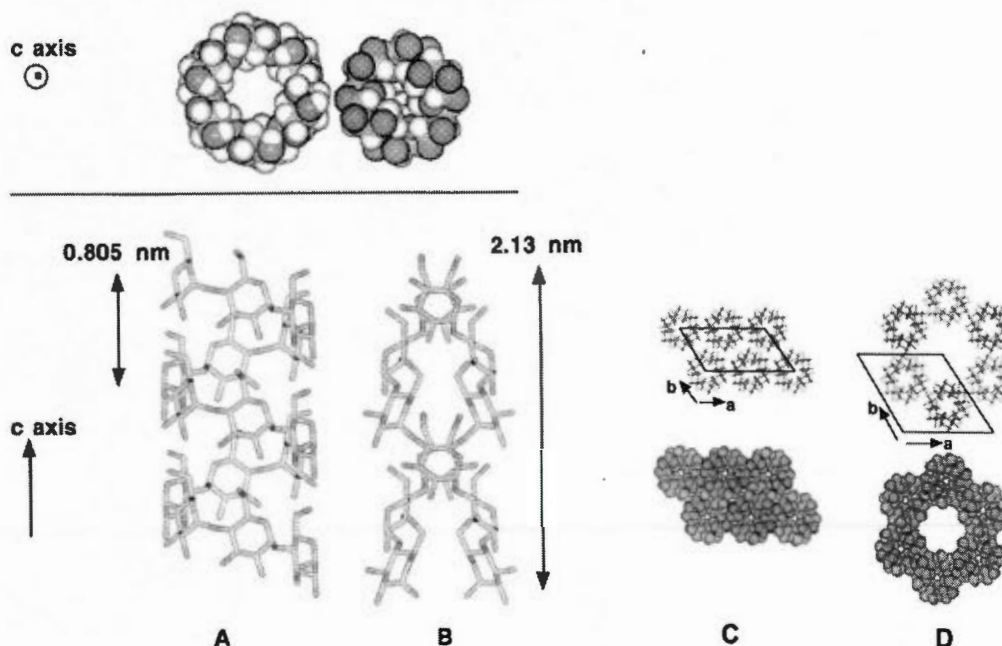


Figure 3.4 Structures moléculaires des chaînes d'amidon: a) Enroulement sous forme de hélice simple (structure de type V), b) enroulement sous forme de double hélice parallèle (structure de type A, B et C), c) conformation d'empaquetage de la structure de type A et d) de la structure de type B (adapté de Buléon *et al.*, 1998).

3.1.3 L'amidon comme excipient pharmaceutique

L'amidon natif est abondamment utilisé comme excipient pharmaceutique principalement pour l'élaboration de formes pharmaceutiques solides. Tel que montré dans le tableau 3.1, l'amidon est un excipient polyvalent qui peut être utilisé pour accomplir différentes fonctions à l'intérieur des formulations en relation avec le type de formes pharmaceutiques solides et le procédé utilisé. L'amidon est utilisé comme agent liant à l'intérieur de formulations produites par granulation humide et comme matériau de remplissage lors de procédés d'encapsulation directe de poudre. L'utilisation prépondérante de l'amidon natif comme excipient pharmaceutique demeure à ce jour celle de désintégrant à l'intérieur des comprimés dû à son insolubilité associée à un fort accroissement du volume des granules (environ 70%) lorsque immergées dans différents milieux de dissolution acides ou neutres (Ingram et Lowenthal, 1966 ; Kottke, Chueh et Rhodes, 1992 ; Lowenthal et Wood, 1973 ; Rowe, Sheskey et Owen, 2006).

Tableau 3.1 Fonctions des amidons natifs utilisés comme excipients pharmaceutiques (adapté de Rowe, Sheskey et Owen, 2006)

Fonction	Concentration (%)
Liant	3 à 20 %
Matériau de remplissage (diluant)	3 à 70 %
Désintégrant	3 à 25 %

3.2 Dérivés d'amidon

Afin d'étendre les fonctionnalités des amidons, les propriétés des amidons natifs peuvent être adaptées au moyen de plusieurs méthodes afin de produire des dérivés d'amidons qui posséderont des propriétés physico-chimiques propres (figure 3.5). Particulièrement, la prégélatinisation, la réticulation des chaînes d'amidon et la substitution des groupes hydroxyles des GU par des groupes fonctionnels ont été utilisés afin d'élaborer des excipient pour des formulations solides à administration orale et à libération contrôlée. Une caractéristique commune de plusieurs de ces dérivés d'amidon est qu'ils possèdent une plus grande résistance à la dégradation par α -amylase que les amidons natifs (Calinescu *et al.*, 2005 ; Copinet *et al.*, 2001 ; Dumoulin, Cartilier et Mateescu, 1999 ; Kwon *et al.*, 1997 ; Rahmouni *et al.*, 2001).

3.2.1 Amidon prégélatinisé et gélatinisation

De ces dérivés d'amidon, l'amidon prégélatinisé est le plus couramment utilisé dans l'industrie pharmaceutique (Pifferi, Santoro et Pedrani, 1999). Les amidons prégélatinisés sont des excipients hydrophiles pour l'élaboration de formes pharmaceutiques solides à libération soutenue (Te Wierik *et al.*, 1997 ; Van der Voort Maarschalk *et al.*, 1997). L'amidon prégélatinisé est un amidon natif pour lequel sa structure cristalline a été modifiée en une structure de type-V afin de le rendre partiellement ou totalement soluble dans l'eau.

Le processus de gélatinisation des amidons se décrit comme étant la désorganisation des liaisons intermoléculaires assurant la stabilité de la structure des chaînes d'amidon (ponts hydrogène) en présence d'eau et de chaleur (Ratnayake, Jackson et Steve, 2008). La

désorganisation des chaînes d'amidon entraîne ainsi leur solubilisation. La gélatinisation est un processus qui peut être décrit en deux étapes (transitions) : (1) la mobilisation (désorganisation) des régions amorphes reliant les cristallites suivi (2) de la désorganisation complète des structures cristallines (figure 3.6). La gélatinisation complète des chaînes d'amidon est un processus irréversible (i.e. les chaînes ne peuvent retrouver leur conformation structurale d'origine), tandis que la mobilisation des régions amorphes est réversible. C'est la propriété d'irréversibilité qui est exploitée pour produire les amidons pré-gélatinisés. Bien qu'usuellement réalisée par un apport de chaleur important (température supérieure à 70 °C) (Ratnayake, Jackson et Steve, 2008), la gélatinisation des amidons peut également s'effectuer à des températures significativement moindres sous des conditions alcalines (Ragheb, Abd El-Thalouth et Tawfik, 1996 ; Ragheb, Abdel-Thalouth et Tawfik, 1995) ou fortement ioniques (Jane, 1993).

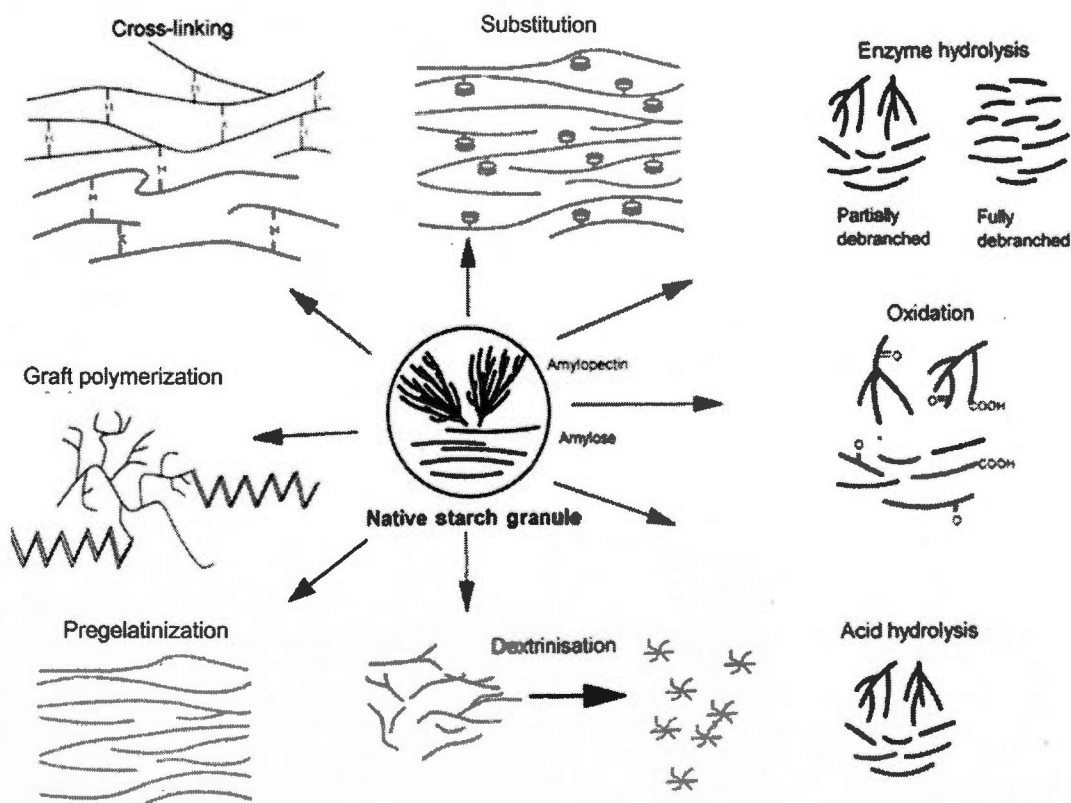


Figure 3.5 Modifications physiques, chimiques et biochimiques des amidons (adapté de Taggart, 2004).

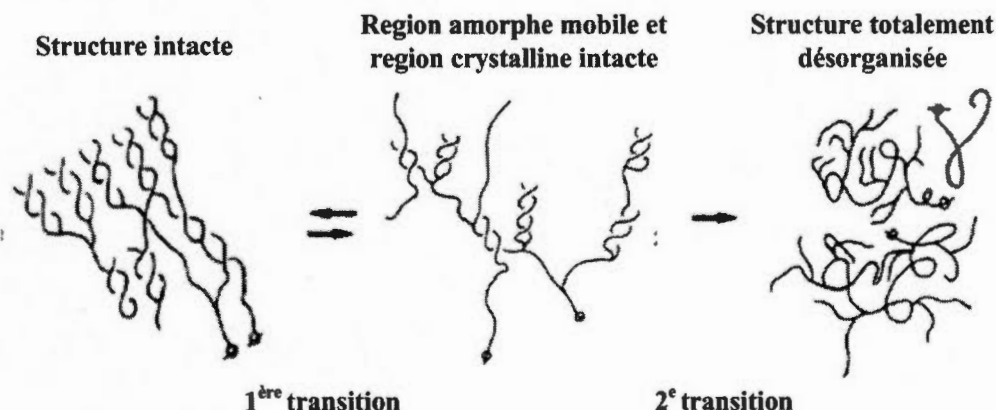


Figure 3.6 Représentation schématique des transitions de phase séquentielles de la structure des amidons lors du phénomène de gélatinisation (adapté de Colonna et Mercier, 1985).

3.2.2 Amidon réticulé

Les amidons réticulés sont également des dérivés d'amidon qui ont connu un essor croissant au cours des dernières années. Tout comme les amidons prégélatinisés, les amidons réticulés sont des excipients hydrophiles pour l'élaboration de formes pharmaceutiques solides à libération soutenue, mais ils possèdent des propriétés de compression supérieures pour l'élaboration de comprimés monolithiques (Lenaerts *et al.*, 1998). Mentionnons ici un amidon réticulé synthétisé à partir d'amidon riche en amylose (Hylon VII) connu sous le nom commercial de Contramid® dont les recherches effectuées par l'équipe du Pr. Mateescu (UQAM) ont permis le développement (Dumoulin *et al.*, 1998 ; Dumoulin, Cartilier et Mateescu, 1999 ; Lenaerts, Dumoulin et Mateescu, 1991 ; Lenaerts *et al.*, 1998 ; Mateescu, Dumoulin et Lenaerts, 1994, 1995).

La réticulation des amidons est la liaison chimique des chaînes les unes avec les autres via les groupes hydroxyles des GU au moyen d'un agent réticulant tel que, l'oxychlorure de phosphore, l'épichlorhydrine et le trimetaphosphate de sodium (STMP) (figure 3.7) (Hirsch et Kokini, 2002).

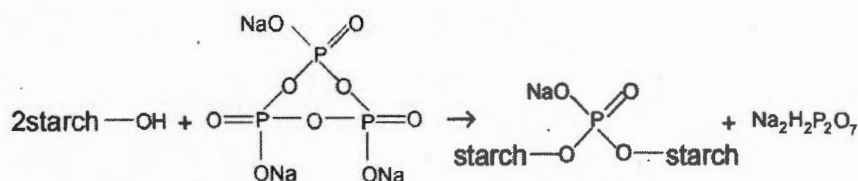


Figure 3.7 Modèle simplifié de la réticulation des chaînes d'amidon au moyen de STMP (Fang *et al.*, 2008).

3.2.3 Amidon substitué et substitution

Il existe une grande variété d'amidons substitués qui ont été développés pour l'élaboration de formes pharmaceutiques solides à libération contrôlée (soutenue et retardée). Les propriétés physico-chimiques des amidons substitués dépendent de la nature du groupe fonctionnel qui leur est attaché et du nombre de ces groupes sur les chaînes (Wurzburg, 1986). La substitution des groupes hydroxyles par des groupes acétyl permet d'obtenir un excipient moins hydrophile (Khalil, Hashem et Hebeish, 1995 ; Korhonen *et al.*, 2004 ; Korhonen *et al.*, 2002 ; Korhonen *et al.*, 2000) tandis que la substitution des groupes hydroxyles par des groupes carboxyméthyl (CM) (Calinescu *et al.*, 2005 ; Mulhbachter *et al.*, 2001), par des groupes hydroxypropyl (Castellano *et al.*, 1997 ; Castellano, Gurruchaga et Goni, 1997) ou par des groupes succinyl (Massicotte, Baille et Mateescu, 2008 ; Urtti *et al.*, 1995) permet d'obtenir des excipients hydrophiles. Il est commun de définir et de caractériser les amidons substitués en terme de degré de substitution (DS) (Newman *et al.*, 1996 ; Wurzburg, 1986). Le DS est exprimé par le nombre moyen de groupes fonctionnels par GU et sa valeur maximale est de trois puisque seulement trois groupes hydroxyles sur les GU sont réactifs (positions 2, 3 et 6). Les méthodes de substitution des groupes hydroxyles par des groupes fonctionnels sont spécifiques à chacun des dérivés d'amidon. La substitution des amidons peut être utilisée pour adapter les propriétés des amidons natifs et tout aussi bien, les propriétés des dérivées d'amidon.

3.3 Le carboxyméthyl amidon

3.3.1 Importance industrielle du carboxyméthyl amidon

Le CMA a été synthétisé pour la première fois en 1924 (Heinze et Koschella, 2005). Depuis ce moment, le CMA est devenu l'un des dérivés d'amidon les plus utilisés comme additif pour des applications autres que celles alimentaires tel que par exemple, d'agent de chélation des métaux lourds, d'agent épaississant, d'agent gélifiant, d'agent colorant ou d'agent lubrifiant et cela, dans une grande variété d'industries (figure 3.8). Le CMA est même abondamment utilisé comme excipient dans l'industrie pharmaceutique, mais il est mieux connu sous le nom de glycolate d'amidon sodique (*sodium starch glycolate*, SSG) pour des raisons historiques. Le SSG commercial est un CMA fortement réticulé avec un DS d'approximativement 0.3 (Bolhuis, Van Kamp et Lerk, 1986 ; Bolhuis *et al.*, 1984) et est utilisé comme désintégrant dans les formulations pharmaceutiques solides (Rowe, Sheskey et Owen, 2006). Cette fonction ne correspond pas à celle des CMA qui sont traités dans cette recherche.

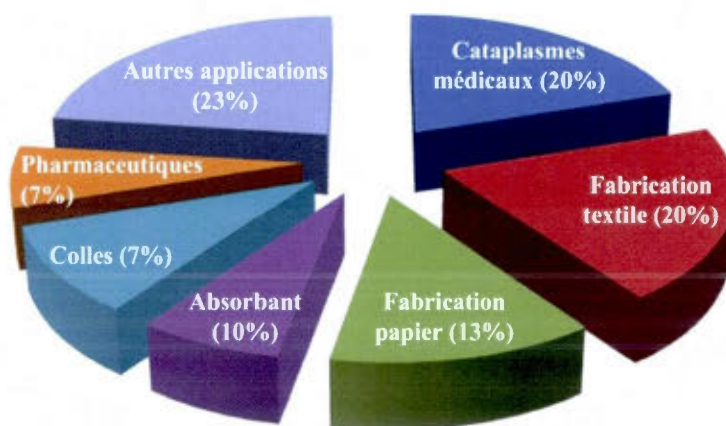


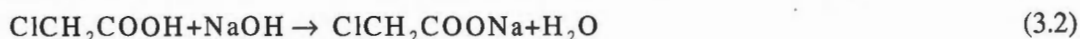
Figure 3.8 Applications industrielles du carboxyméthyl amidon (adapté de Hofreiter, 1986 ; Tijssen, Voncken et Beenackers, 2001).

3.3.2 Carboxyméthylation des amidons

Le carboxyméthyl amidon (figure 3.9) est produit par l'éthérisation des groupes hydroxyles (OH) au moyen d'une substitution nucléophile bimoléculaire (S_N2) avec de l'acide monochloroacétique (AMCA) ou du monochloroacetate de sodium (MCANa) sous des conditions basiques (Khalil, Hashem et Hebeish, 1990 ; Sangseethong, Ketsilp et Sriroth, 2005 ; Tijssen *et al.*, 2001). La première étape de la réaction est une alcalinisation où les groupes GU-OH sont activés et convertis en une forme alcaline plus réactive (GU-O⁻) :



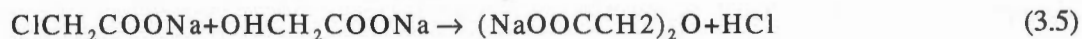
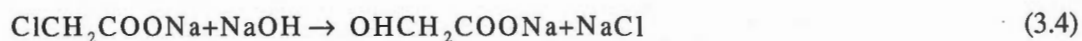
Si l'AMCA est utilisé comme agent d'éthérisation, celui-ci est rapidement neutralisé lors de son addition dans le milieu réactionnel par le NaOH :



La réaction de carboxyméthylation a lieu au cours la deuxième étape :



Lors de la synthèse des CMA, deux réactions secondaires indésirables peuvent également se produire :



L'efficacité de réaction (ER) de carboxyméthylation des amidons se définit par :

$$\text{ER}(\%) = \frac{\text{DS}}{\text{DS}_t} \times 100 \quad (3.6)$$

Où le DS_t est le degré de substitution théorique, déterminé par :

$$DS_t = \frac{n_{RL}}{n_{GU}} \quad (3.7)$$

où n_{RL} and n_{GU} sont respectivement la quantité molaire de réactif limitant (NaOH ou MCANa) et de GU.

À la suite de la carboxyméthylation, les CMA sont sous leur forme sodique (CMA(Na)). Ceux-ci peuvent être convertis sous leur forme acide (CMA(H)) par traitement avec de l'acide chlorhydrique dilué dans un alcool (Heinze et Koschella, 2005). Les CMA(H) sont utilisés pour quantifier la valeur de DS des CMA (nombre moyen de groupement carboxyméthyl par GU) obtenu par de différentes méthodes expérimentales soit, par titrage direct, par précipitation de sel de cuivre, par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire ou par titrage inverse (Heinze *et al.*, 1999 ; Lazik *et al.*, 2002 ; Stojanovic *et al.*, 2005). Cette dernière méthode est recommandée comme procédure standard de quantification du DS des CMA due à sa simplicité, sa précision et sa robustesse démontré lors d'une étude entre plusieurs laboratoires (Mitchell et Wijnberg, 1995 ; Mitchell et Wijnberg, 1997 ; Stojanovic *et al.*, 2005). La méthode de quantification par résonance magnétique a permis, quant à elle, de montrer que la substitution des groupes hydroxyle par les groupes carboxyméthyl s'effectuait préférentiellement sur les hydroxyles à la position 2 (significativement plus élevée), suivie des hydroxyles à la position 6 et finalement des hydroxyles à la position 3 sur les GU (figure 3.9) (Calinescu *et al.*, 2007 ; Heinze, Pfeiffer et Lazik, 2001 ; Lazik *et al.*, 2002).

Récemment, il a été montré par Wu (2011) que les réactions de carboxyméthylation, équation (3.3), et d'hydrolyse du MCANa, équation (3.4), sont des réactions de deuxième ordre compétitives dont les énergies d'activation (E) sont respectivement de 64,77 et 87,72 kJ/mol. Ces résultats démontrent que l'augmentation de la température lors de la réaction de carboxyméthylation diminuera ER par l'augmentation du taux de réaction secondaire, puisque la valeur de E de la réaction secondaire est supérieure à celle de la réaction

principale. À l'opposé, le terme de droite de l'équation (3.1) et le taux de la première réaction secondaire, équation (3.4), sont favorisés par l'augmentation de la température réactionnelle (Tijssen, Voncken et Beenackers, 2001). De plus, l'ensemble des réactions ci-dessus dépendent également de la concentration des réactifs dans le milieu et de la source d'amidon (Stojanovic, Jeremic et Jovanovic, 2000 ; Tijssen *et al.*, 2001 ; Volkert *et al.*, 2004). Ainsi, la maximisation de l'ER de carboxyméthylation des amidons n'est pas un processus direct, mais bien le résultat d'un processus d'optimisation où l'ensemble de ces paramètres devraient être considérés pour une source d'amidon et une méthode de synthèse sélectionnée. Dans un même ordre d'idée, il est possible d'augmenter la valeur de DS des CMA au moyen de réactions de carboxyméthylation successives (Lazik *et al.*, 2002).

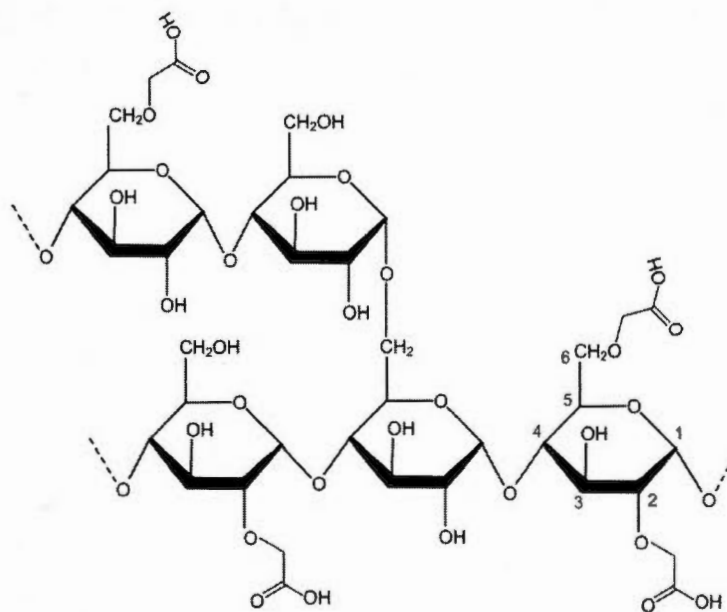


Figure 3.9 Structure chimique du carboxyméthyl amidon. Les chiffres indiquent la numérotation standard de la position des carbones sur un GU.

3.3.3 Méthodes de synthèse des carboxyméthyl amidons

L'utilisation des CMA dans plusieurs industries (figure 3.8) a eu pour conséquence le développement de plusieurs méthodes de synthèse pour la production à diverses échelles. Ces méthodes se divisent selon le milieu de synthèse ou environnemental où se produisent les réactions associées à la carboxyméthylation des amidons (équations 3.1 à 3.5).

La méthode la plus ancienne est la carboxyméthylation des amidons en milieu aqueux (Heinze et Koschella, 2005). Cette méthode se caractérise par la gélatinisation préalable des amidons natifs par l'ajout d'hydroxyde de sodium dans le milieu réactionnel (aqueux) avant l'ajout du MCA(Na). Cette gélatinisation solubilise les amidons en une seule phase et est donc observable dans le réacteur tout au long de la réaction. À la fin de la réaction, cette méthode requiert que les CMA produits soient précipités, purifiés et séchés afin de pouvoir les utiliser sous forme de poudre.

La méthode de synthèse diphasique en milieu organique se distingue de la méthode en milieu aqueux par le remplacement du milieu réactionnel avec un mélange de solvant organique (acétone, éthanol, méthanol ou propan-2-ol) et d'eau (Lawal *et al.*, 2007 ; Lawal, Lechner et Kulicke, 2008 ; Sangseethong, Ketsilp et Siroth, 2005 ; Tijssen *et al.*, 2001 ; Tijssen *et al.*, 1999 ; Tijssen, Voncken et Beenackers, 2001). L'avantage principal de cette méthode est que les poudres d'amidon demeurent sous forme solide (granulaire) tout au long de la réaction facilitant ainsi leur récupération, leur purification et leur séchage (Tijssen, Voncken et Beenackers, 2001). La synthèse diphasique en milieu organique permet également de produire des CMA avec des DS et ER plus élevés que la synthèse aqueuse (Volkert *et al.*, 2004). La carboxyméthylation des amidons par réaction diphasique en milieu organique est la méthode la plus utilisée industriellement pour produire les CMA (Heinze et Koschella, 2005). Des procédés de synthèse diphasique en milieu organique en mode continu ont même été développés afin d'accroître les capacités de production des CMA à l'échelle industrielle (figure 3.10).

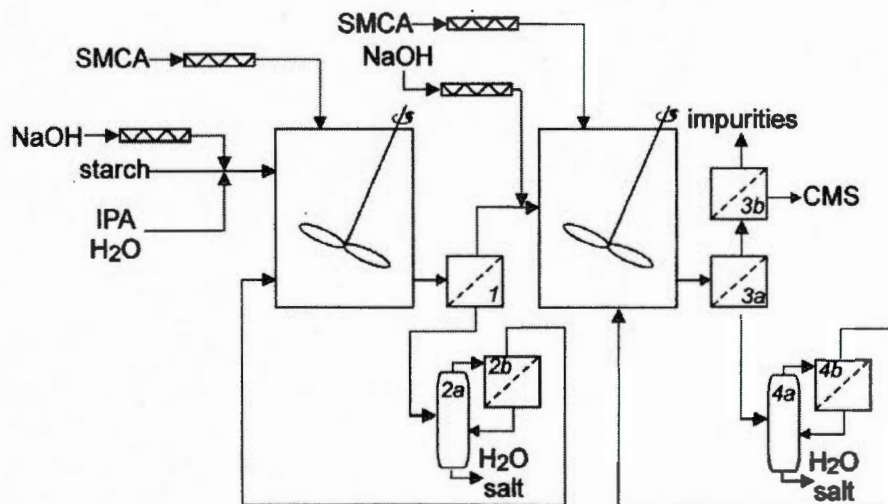


Figure 3.10 Schéma de procédé pour la production en mode continu de CMA par réaction diphasique en milieu organique (Tijssen, Voncken et Beenackers, 2001).

Une variante de la synthèse aqueuse et par réaction diphasique en milieu organique est la synthèse des CMA assistée par micro-onde. Cette méthode s'effectue de façon similaire aux synthèses aqueuses et diphasiques en milieu organique, mais à la différence que l'énergie nécessaire à l'accomplissement des réactions, réalisées dans un réacteur confiné, est fournie par des micro-ondes (Koroskenyi et McCarthy, 2002 ; Zhongdong, 1998 ; Zhongdong, Peng et Kennedy, 2005). Cette méthode offre l'avantage de réduire la quantité de milieux nécessaires à la réaction et, surtout, de réduire le temps de réaction par un ordre de grandeur (Koroskenyi et McCarthy, 2002).

La dernière méthode de synthèse des CMA est la méthode par procédé sec (Parvathy *et al.*, 2005). Pour cette méthode, les CMA sont produits par la réaction à l'état solide d'un mélange d'amidon, de bicarbonate de sodium et d'AMCA. L'avantage de cette méthode est qu'elle ne nécessite pas de solvant (aqueux ou organique). Toutefois, la purification des CMA produits nécessite tout de même l'emploi de solvant organique. Cette méthode et celle assistée par micro-onde ont été employées pour produire des CMA à l'échelle du laboratoire.

3.3.4 Carboxyméthyl amidon : excipient pour la libération contrôlée

Il existe deux formes de CMA utilisées comme excipient pour assurer la libération contrôlée de PA à partir de formes solides à administration orale. La première forme correspond aux CMA synthétisés à partir d'amidon natif et la seconde forme correspond aux CMA synthétisés à partir d'amidon réticulé. Pour les besoins de cette thèse, l'abréviation CMA (à moins de précision contraire) fera référence à la forme non réticulée ainsi qu'à la forme sodique des CMA.

Mulhbacher *et al.* (2001) ont été les premiers à proposer la carboxyméthylation afin d'ajouter un caractère ionique aux matrices d'amidons riches en amylose réticulée (neutre). Ainsi, à partir de comprimés monolithiques à base de CMA (DS 0,08 et 0,12) réticulé, ils ont montré qu'il était possible de soutenir la libération de plusieurs PA (acétaminophène, acide acétylsalicylique et metformine) sur des périodes pouvant atteindre plus de 20 heures. Les temps de libération étaient pour la plupart, supérieurs au témoin (amidon réticulé) et étaient fonction du PA, de la teneur de PA (jusqu'à 60%) et de la valeur du DS. Ces résultats suggéraient que la libération des PA à partir des matrices de CMA réticulé était dépendante des interactions ioniques entre les PA et les groupes CM. La dépendance du contrôle de la libération des PA à partir des matrices de CMA réticulés aux interactions ioniques (attractives et répulsives) a été montrée de nouveau par l'étude du gonflement des matrices de CMA et de diffusion de PA (benzylamine, acide phénylacétique) à partir desdites matrices sous des conditions variables de pH et de force ionique (Mulhbacher, Ispas-Szabo et Mateescu, 2004 ; Mulhbacher et Mateescu, 2005). Il a été également montré que les CMA (DS 0,12) réticulés possédaient de meilleures propriétés mucoadhésives que l'amidon réticulé sous des conditions neutres (pH 7,5) et acides (pH 1,2) (Mulhbacher *et al.*, 2006). Ces résultats suggéraient que le caractère ionique du groupe CM des CMA réticulés pouvait jouer un rôle dans les mécanismes de mucoadhésion. Onofre *et al.* (2009 ; 2010) ont montré que les propriétés des matrices de CMA (DS 0,2 à 0,6) réticulés (synthétisés à partir d'amidon de patate, d'amidon riche en amylose et d'amidon de maïs) à soutenir la libération du chlorhydrate de propranolol étaient fortement influencées par la source d'amidon interdépendamment au niveau de réticulation et à la valeur de DS.

Calinescu et al. (2005) ont été les premiers à montrer que la réticulation des chaînes d'amidon n'était pas nécessaire aux CMA afin d'assurer la stabilité physique de la matrice dans les milieux de dissolutions, au contraire de l'amidon témoin (HAS-0). Cette propriété est particulièrement observée dans le FGS (pH 1,2) (figure 3.11). À partir de comprimés monolithiques à base de CMA avec des DS variant de 0,06 à 0,66, ils ont montré que les propriétés de protection d'*Escherichia Coli* (*E. Coli*) (5%) par la matrice contre le FGS et de sa libération subséquente dans le FIS_{Pan} (pH 6,8) étaient dépendantes de la valeur du DS. Un CMA avec un DS de 0,06 offrait la meilleure protection dans le FGS et la libération rapide dans le FIS d'*E. Coli*, suivie du CMA avec un DS de 0,33 et finalement du DS 0,66. Toutefois, la matrice de CMA avec un DS de 0,06 présentait un gonflement non uniforme dans le FIS_{Pan}. La figure 3.11 illustre la dépendance des matrices de CMA à la valeur du DS où le gonflement des matrices de CMA variait significativement en fonction de la valeur du DS.

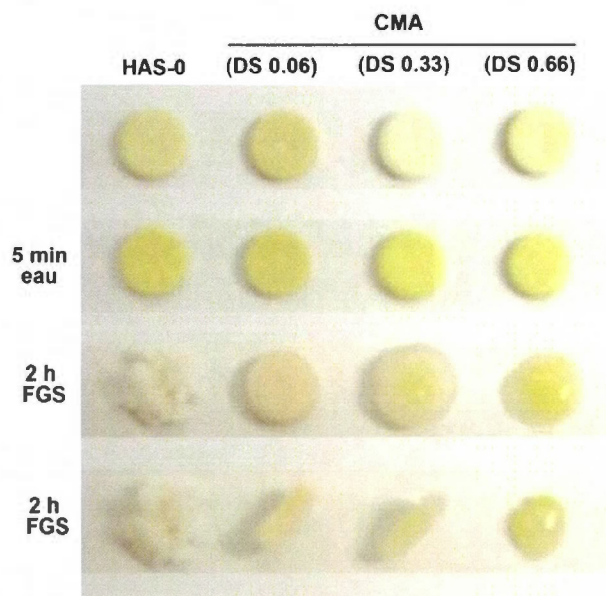


Figure 3.11 Stabilité physique des comprimés monolithiques à base de CMA incubés dans le FGS (adapté de Calinescu *et al.*, 2005).

Par la suite, en utilisant des comprimés monolithiques à base de CMA avec des DS variant de 0,03 à 0,3, il a été montré que ces matrices pouvaient assurer la libération soutenue d'une variété de PA possédant des propriétés physico-chimiques différentes tel que : l'acétaminophène (Brouillet, Bataille et Cartilier, 2008 ; Brouillet *et al.*, 2010 ; Ispas-Szabo *et al.*, 2007 ; Nabais *et al.*, 2007), l'acide acétylsalicylique (Ispas-Szabo *et al.*, 2007), le diclofenac de sodium (Ispas-Szabo *et al.*, 2007) sur des périodes pouvant atteindre jusqu'à 20 heures dans le fluide intestinal simulé sans pancréatine (FIS, pH 6,8). Les matrices de CMA pouvaient également assurer la protection contre le FGS et la libération subséquente dans le FIS d'une variété d'agents bioactifs tels que : des enzymes pancréatiques (Massicotte, Baille et Mateescu, 2008), des extraits de protéines de plante (De Koninck *et al.*, 2009) et de *fimbriae F4* (Calinescu *et al.*, 2007). Ces études ont pour caractéristiques communes d'avoir utilisé la méthode de synthèse aqueuse pour produire leur CMA et ceux-ci ont été utilisés sous leur forme sodique. De plus, à l'exception de Nabais *et al.* (2007) et Brouillet *et al.* (2008 ; 2010), le type d'amidon natif ayant servi à la synthèse des CMA est un amidon riche en amylose (Hylon VII). Ces premiers ont quant à eux synthétisé leur CMA à partir d'un amidon prégélatinisé disponible commercialement. Ceux-ci recommandaient de formuler les comprimés monolithiques à base de CMA avec une quantité optimale de chlorure de sodium (figure 3.12a) afin d'améliorer leur propriétés de libération soutenue. L'ajout de chlorure de sodium à l'intérieur de la matrice avait également pour conséquence de rendre les cinétiques de libérations totalement indépendantes aux différents gradients de pH (figure 3.12b) et aux différentes forces de compression. Finalement, il a été montré que la résistance des CMA à la dégradation par α -amylase augmentait avec la valeur du DS (entre 0,06 et 0,66) (Calinescu *et al.*, 2005), mais bien que possédant une plus grande résistance, les propriétés de contrôle de libération des matrices de CMA (DS 0,33) étaient fortement influencées par la présence ou non de pancréatine (avec l' α -amylase) dans le FIS (figure 3.13) (Calinescu *et al.*, 2007).

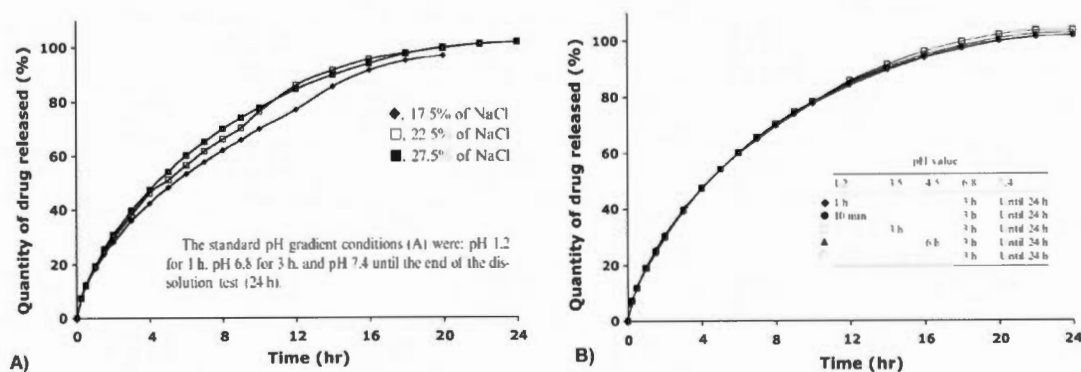


Figure 3.12 Influence a) de l'augmentation de la proportion de chlorure de sodium (NaCl) et b) du gradient de pH sur la libération de l'acétaminophène (40%) à partir de comprimés monolithiques à base de CMA (valeur de DS inconnue, 600 mg) (adapté de Nabais *et al.*, 2007).

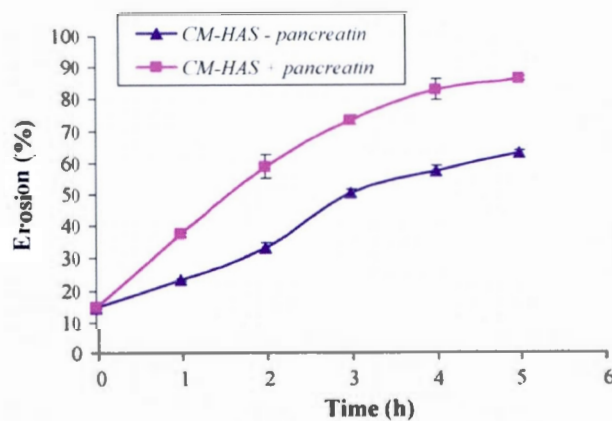


Figure 3.13 Influence de la pancréatine (contenant de l' α -amylase) dans le FIS sur l'érosion de comprimés monolithiques à base de CMA (DS 0,33, masse comprimée 200 mg) (Calinescu *et al.*, 2007).

DEUXIÈME PARTIE

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE IV

PROJET DE RECHERCHE

4.1 Problématiques

Les chapitres précédents ont montré que les propriétés des excipients utilisés comme agent fonctionnel à l'intérieur de formulations pharmaceutiques à administration orale déterminent en grande partie l'efficacité thérapeutique de ces formulations. Ces propriétés correspondent tant aux propriétés intrinsèques des excipients qu'aux résultats des interactions entre les excipients et les PA et entre les excipients et les différents milieux physiologiques existant dans le TGI. Lors du développement d'un nouvel excipient, devant la multitude et la complexité des influences des excipients sur l'efficacité thérapeutique des médicaments, il est primordial de caractériser l'ensemble de ces propriétés. Bien qu'il fût précédemment démontré que les CMA sont des excipients permettant l'élaboration de formulations à administration orale à libération contrôlée, il demeure encore de nombreuses interrogations concernant ses propriétés ainsi que leurs incidences sur les caractéristiques des formulations. Ces interrogations dans le contexte des excipients pharmaceutiques se définissent à partir des problématiques suivantes sur les CMA déjà étudiés :

- La valeur de DS maximale des CMA est de 3 (section 3.3), mais uniquement des CMA possédant de faibles DS (inférieur 0,4) ont été utilisés comme excipient;
- Il est possible de produire des CMA sous deux formes, sodique et acide (3.3.3), mais seuls les CMA sous forme sodique ont été utilisés comme excipient;

- Plusieurs méthodes de synthèse permettent de produire les CMA (section 3.3.3), mais les CMA utilisés comme excipients ont tous été produit qu'au moyen de synthèse (aqueuse);
- Il existe une multitude de source d'amidon (section 3.1.1), mais les CMA les CMA utilisés comme excipients ont été synthétisés à partir d'un nombre limité de types d'amidon;
- La caractérisation de l'ensemble des propriétés des CMA incluant les propriétés structurales, toxicologiques et de résistance à la dégradation par l' α -amylase est limitée (section 3.3.4);
- Parmi toutes les formes pharmaceutiques à administration orale (section 2.1.1), les CMA ont été uniquement utilisés pour l'élaboration d'une seule forme pharmaceutique solide (comprimé monolithique);
- La corrélation entre les influences des propriétés des CMA sur les propriétés *in vitro* des formes solides est limitée (section 3.3.4);
- Les influences des propriétés des CMA sur les propriétés des formulations sont confondues avec les influences des propriétés des PA ou agents bioactifs dont les propriétés varient en fonction du milieu environnant (section 3.3.4);
- La caractérisation des mécanismes contrôlant la libération des PA à partir des formulations à base de CMA est limitée (section 3.3.4);
- Il n'y a pas de comparaison des performances de CMA avec d'autres excipients couramment utilisés pour l'élaboration de formulations pharmaceutiques à libération contrôlée, incluant la sélection appropriée des contrôles lors de la réalisation des études sur les CMA (section 3.3.4);
- La caractérisation des interactions des CMA avec les muqueuses du TGI est inexhaustive (section 3.3.4).

Il est à noter que le relèvement de ces problématiques au sujet des propriétés des CMA et des formulations à base de CMA ne remet pas en question l'utilisation ou les capacités des CMA comme excipient pour l'élaboration de formulation pharmaceutique à libération contrôlée, mais s'inscrit dans un processus normal de développement d'un nouvel excipient afin de cibler et de stimuler la poursuite de la caractérisation desdites propriétés.

4.2 Hypothèses de travail

L'éclaircissement des problématiques posées précédemment est donc nécessaire afin de pouvoir établir les CMA comme excipients multifonctionnels permettant d'assurer ou, ultimement, d'améliorer l'efficacité thérapeutique des PA. Le concept soutenant la carboxyméthylation des amidons est d'obtenir un excipient hydrophile anionique modulant la libération des PA en fonction des conditions du milieu environnant. Il a été démontré par Calinescu *et al.* (2005 ; 2007) et Mulhbachter *et al.* (2001 ; 2004), que le DS des CMA est l'un des facteurs majeurs déterminant les propriétés de libération des médicaments, même si ceux-ci sont faiblement substitués.

En ce sens, l'hypothèse principale sur laquelle cette recherche repose est que la capacité de modulation des taux de libération des PA des CMA augmente avec l'élévation du DS. Cette modulation des taux de libération des PA serait le résultat de la modification de la somme des forces d'interaction entre les chaînes de CMA en fonction du pH du milieu environnant. En effet, sous des conditions acides telles que celles se retrouvant dans l'estomac humain, l'augmentation du DS permettrait d'accroître les forces attractives (ponts hydrogènes) entre les chaînes de CMA avoisinantes par la plus grande présence des groupes CM protonnés (-COOH). L'augmentation des forces attractives conférerait à la forme solide une structure dont le gonflement ou l'érosion serait réduit, ce qui limiterait par le fait même le taux de libération des PA. De plus, il est rationnel de présumer que ces forces attractives seront amplifiées par la dimérisation des groupes CM protonnés facilitée par l'augmentation du DS.

À l'opposé, sous des conditions neutres telles que celles observées dans les intestins, l'augmentation du DS entraînerait un accroissement des forces répulsives entre les chaînes de CMA dû à l'augmentation du nombre de groupes CM dissociés (-COO⁻), ce qui pourrait

induire une libération plus rapide des PA par l'accélération du gonflement ou l'érosion de la forme solide à base de CMA. Toutefois, l'augmentation de la résistance des CMA à l'amylolyse par l' α -amylase avec l'augmentation du DS, tel que rapporté par Kwon *et al.* (1997), pourrait être un facteur supplémentaire à considérer pour établir une corrélation entre les mécanismes de libération des PA dans les milieux neutres et le DS.

Dans le même ordre d'idées, il est possible d'ajouter l'hypothèse que l'élévation du DS augmente les propriétés mucoadhésives des CMA par l'accroissement des forces d'interaction avec les muqueuses du TGI. Sous des conditions acides, l'élévation du DS des CMA augmenterait le potentiel de formation de ponts hydrogènes entre les groupes CM protonnés et les mucines composant les muqueuses de l'estomac. Or, sous des conditions neutres, l'augmentation du DS pourrait modifier la conformation spatiale des CMA par l'action des forces répulsives induites par les groupes CM dissociés, ce qui permettrait ainsi de favoriser les mécanismes de mucoadhésion par l'accroissement de l'interpénétration des chaînes de CMA et des glycoprotéines à la surface des muqueuses intestinales.

Les hypothèses émises ci-dessus se rapportent aux influences que peut avoir directement l'augmentation du DS des CMA sur les propriétés de libération des PA ainsi que sur la mucoadhésion des formulations solides administrées par voie orale. Ces propriétés peuvent également être influencées par les propriétés structurales et physico-chimiques des CMA sous forme de poudre et par les propriétés physiques des formulations solides à base de CMA. Ainsi, une autre série d'hypothèses sont posées autour desquelles s'articulera cette thèse. Tout d'abord, pour un même DS, la méthode de synthèse des CMA, les méthodes de production des poudres de CMA (par exemple, le séchage) et les méthodes de production des formes solides à base de CMA ainsi que, dans un second temps, l'augmentation du DS peuvent modifier les propriétés structurales et physico-chimiques à la fois des CMA et des formulations à base de CMA.

4.3 Objectifs spécifiques de recherche

L'objectif principal de ce projet consiste à poursuivre le développement des CMA comme nouvel excipient pharmaceutique multifonctionnel par la caractérisation des propriétés des formulations solides à administration orale à base de CMA (excipient exclusif) en corrélation avec la caractérisation des propriétés propres des CMA. En vertu des problématiques soulevées et des hypothèses de recherche posées dans cette thèse, nous avons proposé plus spécifiquement de :

1. Synthétiser des CMA faiblement substitués ($DS < 0,25$) où pour chaque DS, différentes poudres de CMA seront obtenues par différentes méthodes de séchage et ainsi, de vérifier l'influence du DS et des méthodes de séchage sur les propriétés structurales et physico-chimiques des CMA ainsi que sur les propriétés de libération de médicaments de ces CMA formulés sous forme de comprimés monolithiques, dans des conditions simulant celles qui se retrouvent dans le TGI (conditions acides suivies des conditions neutres);
2. Synthétiser des CMA sous forme sodique de faiblement à hautement substitués (DS de 0 à 1,75) par réaction diphasique dans un milieu organique, ultérieurement convertis sous forme acide, et de déterminer l'influence du DS, en fonction de la forme (acide ou sodique), sur les propriétés physico-chimiques des CMA ainsi que sur les propriétés de libération de médicaments de ces CMA sous forme de comprimés monolithiques, dans des conditions reproduisant celles du TGI (conditions acides ou neutres);
3. Développer des MS-CMA mucoadhésives à partir de CMA possédant différents DS ($0 < DS < 1,5$) et d'évaluer leurs propriétés physico-chimiques, de libération de médicaments et de mucoadhésion sous des conditions reproduisant celles du TGI (acides ou neutres) ainsi que leurs interactions avec des modèles des barrières épithéliales du TGI (barrière gastrique ou intestinale);

Il est à noter qu'il n'existait pas, au début de ce projet, de modèle de la barrière épithéliale gastrique pour évaluer les interactions entre celle-ci et les MS-CMA. Nous avons également proposer :

- 3.1 De déterminer la faisabilité d'utiliser la lignée cellulaire humaine gastrique NCI-N87 cultivée sur des filtres comme modèle *in vitro* pour évaluer la perméabilité gastrique des PA sous des conditions similaires à celles qui de l'estomac humain.

4.4 Contributions à la recherche

Au cours de la réalisation de cette thèse, les principaux résultats de recherche obtenus pour accomplir respectivement chacun des objectifs spécifiques décrits précédemment ont été communiqués sous forme d'articles scientifiques, publiés ou en voie de soumission, à des revues avec comité de lecture. La liste de ces articles constituant cette thèse est disponible ci-dessous, suivant leur ordre de présentation dans les chapitres subséquents:

- Chapitre V: Lemieux, M., P. Gosselin et M. A. Mateescu. 2010. «Influence of Drying Procedure and of Low Degree of Substitution on the Structural and Drug Release Properties of Carboxymethyl Starch». *AAPS PharmSciTech.*, vol. 11, p. 775-785.
- Chapitre VI: Lemieux, M., P. Gosselin et M. A. Mateescu. 2009. «Carboxymethyl high amylose starch as excipient for controlled drug release: Mechanistic study and the influence of degree of substitution». *Int. J. Pharm.*, vol. 382, p. 172-182.
- Chapitre VII: Lemieux, M., F. Bouchard, P. Gosselin, J. Paquin et M. A. Mateescu. 2011. «The NCI-N87 cell line as a gastric epithelial barrier model for drug permeability assay». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 412, p. 429-434.

Chapitre VIII: Lemieux, M., P. Gosselin et M. A. Mateescu. «Carboxymethyl starch mucoadhesive microspheres: a gastroretentive dosage form». *En voie de soumission à la revue Int. J. Pharm.* (Septembre 2012).

Les résultats de recherche obtenus ont également été le sujet d'autres contributions : des communications sous forme d'affiche ou de présentation orale présentées lors de rencontres scientifiques.

Même si ces contributions ne répondent pas directement à chacune des problématiques soulevées précédemment. L'analyse globale et comparative de l'ensemble des résultats présentés apporte une contribution supplémentaire à la compréhension des propriétés des CMA utilisés comme excipient pharmaceutique. Cette analyse est effectuée dans le cadre d'une discussion (chapitre IX). En fait, cette thèse ne vise pas à répondre systématiquement à chacune de ces problématiques, mais plutôt de répondre à la majorité d'entre elles dans un ordre logique et séquentiel qui permettra subséquemment de poursuivre le développement des CMA comme excipient multifonctionnel pour l'élaboration de formes pharmaceutiques solides à libération contrôlée.

4.5 Approche méthodologique

Étant donné que les méthodes expérimentales utilisées lors de la réalisation des manuscrits constituant le corps de cette thèse sont décrites en détail à l'intérieur de chacune de leurs sections « *materials and methods* » respectives (sections 5.2.4, 6.2.4, 7.2.6 et 8.2.5), le propos de la présente section est, en premier lieu, de présenter l'approche méthodologique globale ayant servi à caractériser les propriétés des CMA et la lignée cellulaire NCI-N87 ainsi que, en second lieu, de présenter certaines démarches expérimentales réalisées préliminairement à la réalisation des manuscrits traitant respectivement de l'augmentation du DS des CMA utilisés comme excipient (chapitre VI) et des MS-CMA mucoadhésives (chapitre VIII).

L'approche méthodologique générale utilisée pour répondre aux problématiques et aux objectifs spécifiques de cette thèse a été élaborée pour permettre de discriminer au maximum les influences intensives et extensives (non linéaires et combinatoires) des CMA formulés

sous forme solide afin d'identifier les propriétés des CMA qui sont réellement significatives pour l'élaboration de formes pharmaceutiques solides. Les figures 4.1 à 4.3 présentent des résumés schématiques des approches méthodologiques ayant servies à réaliser respectivement les articles des chapitres V, VI et VIII. Il est possible d'observer que ces approches méthodologiques ont toutes pour point de départ la synthèse des CMA soit par carboxyméthylation en milieu aqueux (figure 4.1), soit par carboxyméthylation par réaction diphasique en milieu organique (figures 4.2 et 4.3). Dans le cas spécifique de l'article traitant de l'influence de hauts DS sur les propriétés des CMA (chapitre VII et figure 4.2), la synthèse des CMA par réaction diphasique en milieu organique fut précédée d'une étape d'optimisation des conditions de synthèse. L'essentiel de cette optimisation est présenté à la section 4.5.1 ci-dessous. Les CMA possédant différents DS synthétisés lors des différentes études ont été par la suite traités physiquement, par l'emploi de différentes méthodes de séchage (figure 4.1), ou chimiquement, par la conversion de la forme sodique des CMA en leur forme acide (figure 4.2), afin d'obtenir des CMA qui devraient posséder différentes propriétés pour un même DS.

Les CMA sous forme de poudre ainsi produits ont été utilisés pour élaborer des comprimés monolithiques chargés avec de l'acétaminophène (figures 4.1 et 4.2) ou des microsphères chargées ou non (placebo, PL) avec de la furosémide (figure 4.3). Pour ce dernier cas, la détermination de la méthode de production des microsphères et l'optimisation de la méthode sélectionnée a également été l'objet d'une étape préalable à la réalisation de l'étude. Cette démarche expérimentale est présentée dans la section 4.5.2. Dans le cas des comprimés monolithiques, l'acétaminophène a été choisi comme PA modèle dû au fait que l'acétaminophène est une molécule neutre, *i.e.* non ionisable aux valeurs de pH physiologique (acide faible avec un pKa de 9,7), et qu'elle ne montre qu'une très faible différence de solubilité en fonction du pH, 21,3 mg/mL à pH 1,2 et 17,8 mg/mL à pH 6,8 à 37 °C (Takahashi *et al.*, 2005). Ces propriétés permettent donc de discriminer l'influence du PA sur les propriétés de libération *in vitro* des médicaments à partir des comprimés de CMA dans différents milieux de dissolution. À l'inverse, dans le cas des MS-CMA, la furosémide a été choisie comme PA modèle non favorable (« *worst case scenario* ») aux propriétés des microsphères afin de démontrer de façon plus marquée les capacités des CMA, en fonction de

leur DS, à être utilisés pour la production desdites microsphères. En effet, la furosémide est une molécule qui s'ionise à un pH supérieur à la valeur de son pKa de 3,8 (Klausner *et al.*, 2003), où cette ionisation peut interférer avec les forces d'interaction entre les chaînes de CMA. De plus, la furosémide est un modèle pertinent pour le développement de microsphères mucoadhésives tel que souligné par Davis (2005) étant donné que la furosémide possède une relativement faible et variable absorption orale (50-60%), laquelle absorption se produit dans l'estomac et dans la partie supérieure l'intestin. La biodisponibilité limitée de la furosémide est attribuable à sa faible solubilité en milieu acide (5 à 20 µg/mL) et que malgré une plus grande solubilité en milieu neutre (2,25 mg/mL), la furosémide est un substrat des protéines d'efflux de médicaments (Kaukonen *et al.*, 2007 ; Pade et Stavchansky, 1998).

Les figures 4.1 à 4.3 montrent que la caractérisation des propriétés des CMA produits et des formulations élaborées à base de ces CMA, laquelle sert à répondre aux objectifs de recherche de cette thèse, a été par la suite réalisée à trois niveaux distincts, soient :

- Caractérisation des propriétés structurelles;
- Caractérisation des propriétés physico-chimiques;
- Caractérisation des propriétés fonctionnelles.

où une attention particulière a été portée *a posteriori* sur la corrélation globale de l'influence de l'ensemble de ces propriétés les unes par rapport aux autres (identifiées par des flèches rouges sur les figures).

La caractérisation des propriétés structurelles se réfère à l'organisation des macromolécules à l'intérieur des CMA sous forme solide à la suite de leur synthèse ou de leur utilisation pour produire les formulations. Les méthodes utilisées pour caractériser ces propriétés structurelles sont l'analyse des poudres par diffraction de rayons X, qui a permis d'établir le type de structure des CMA (type-B, -V ou amorphe), et la calorimétrie différentielle à balayage (CDB), qui a permis de confirmer la présence ou non de cristallites à l'intérieur des CMA. Dans le cadre de l'approche méthodologique utilisée au cours de cette thèse pour caractériser

les CMA, l'évaluation des propriétés structurales est effectuée sur une base comparative, *i.e.* entre les différents DS et les différentes méthodes de production ainsi qu'en comparaison avec des témoins, soit l'amidon natif (Hylon VII) et des amidons non carboxylés, mais traités avec du NaOH.

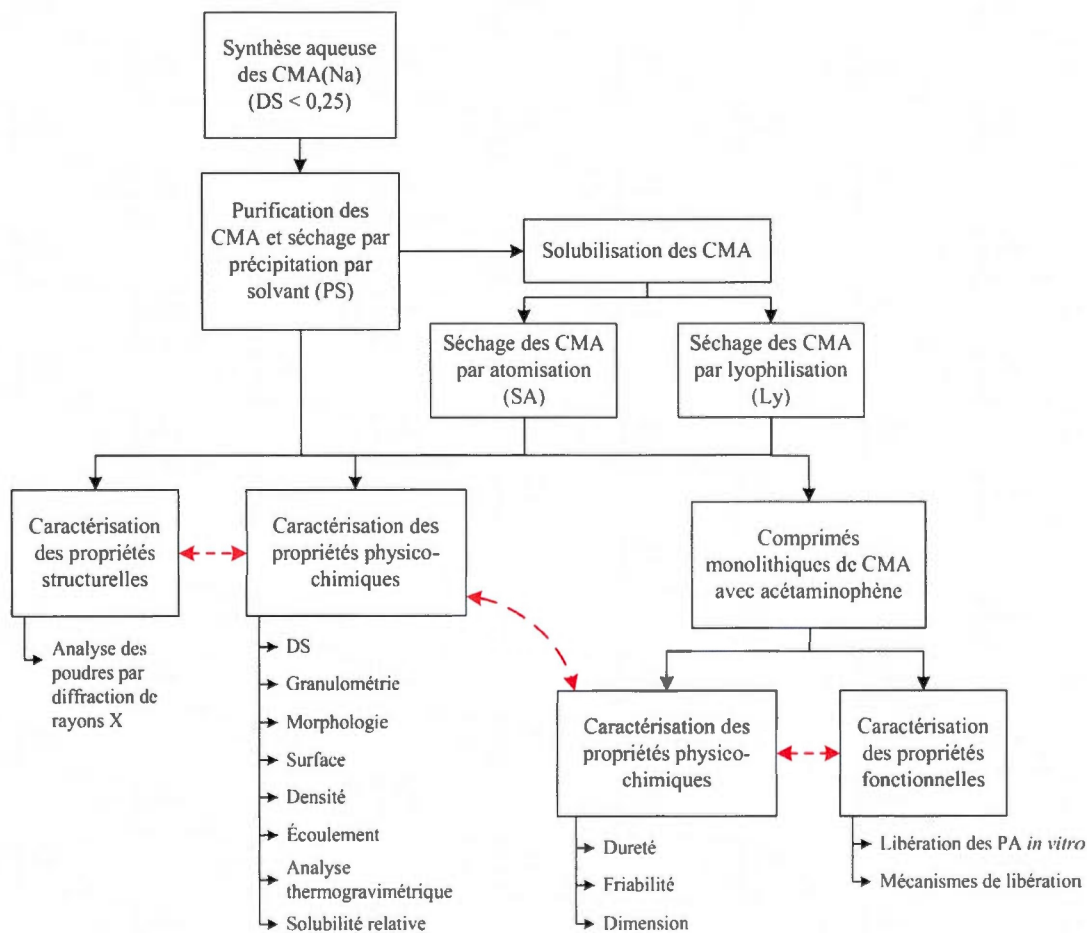


Figure 4.1 Représentation schématique de l'approche méthodologique développée et utilisée pour étudier l'influence du DS et des méthodes de séchage des CMA (chapitre V).

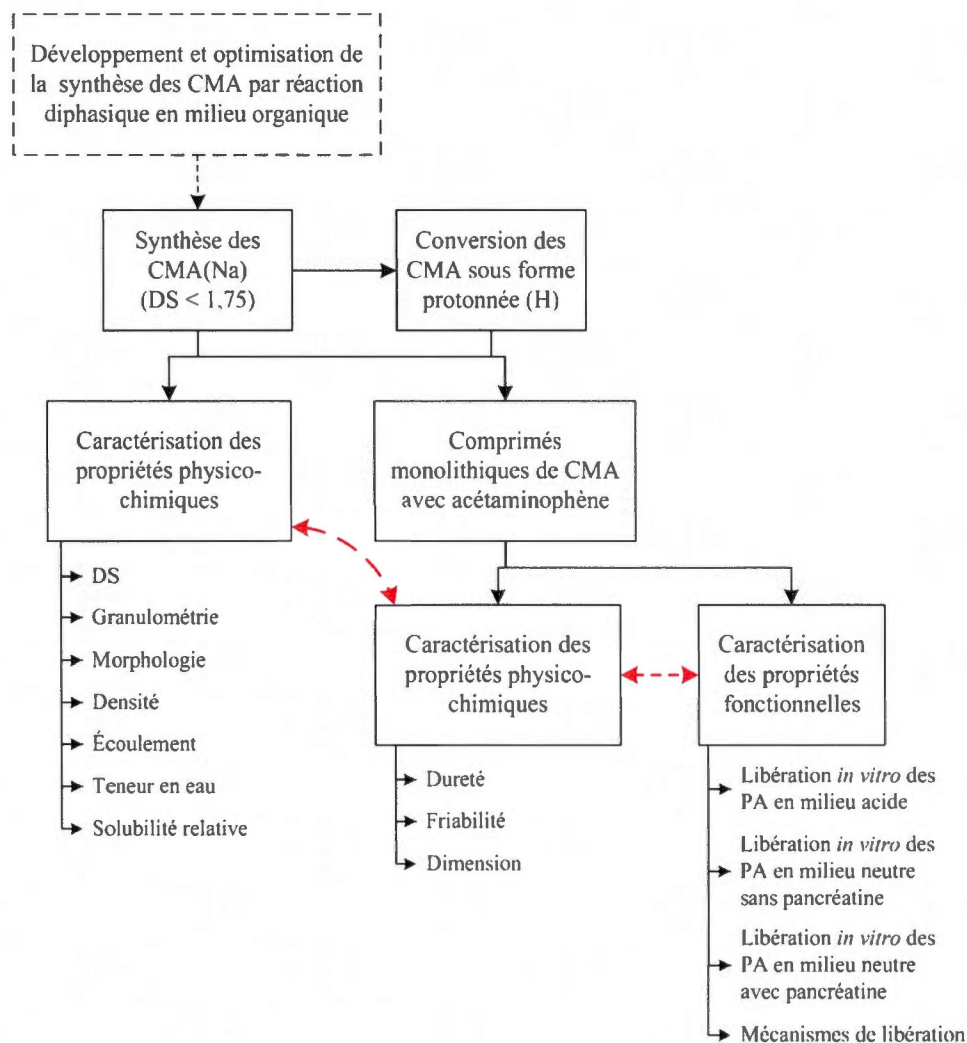


Figure 4.2 Représentation schématique de l'approche méthodologique développée et utilisée pour étudier l'influence du DS des CMA synthétisés par réaction diphasique en milieu organique (chapitre VI).

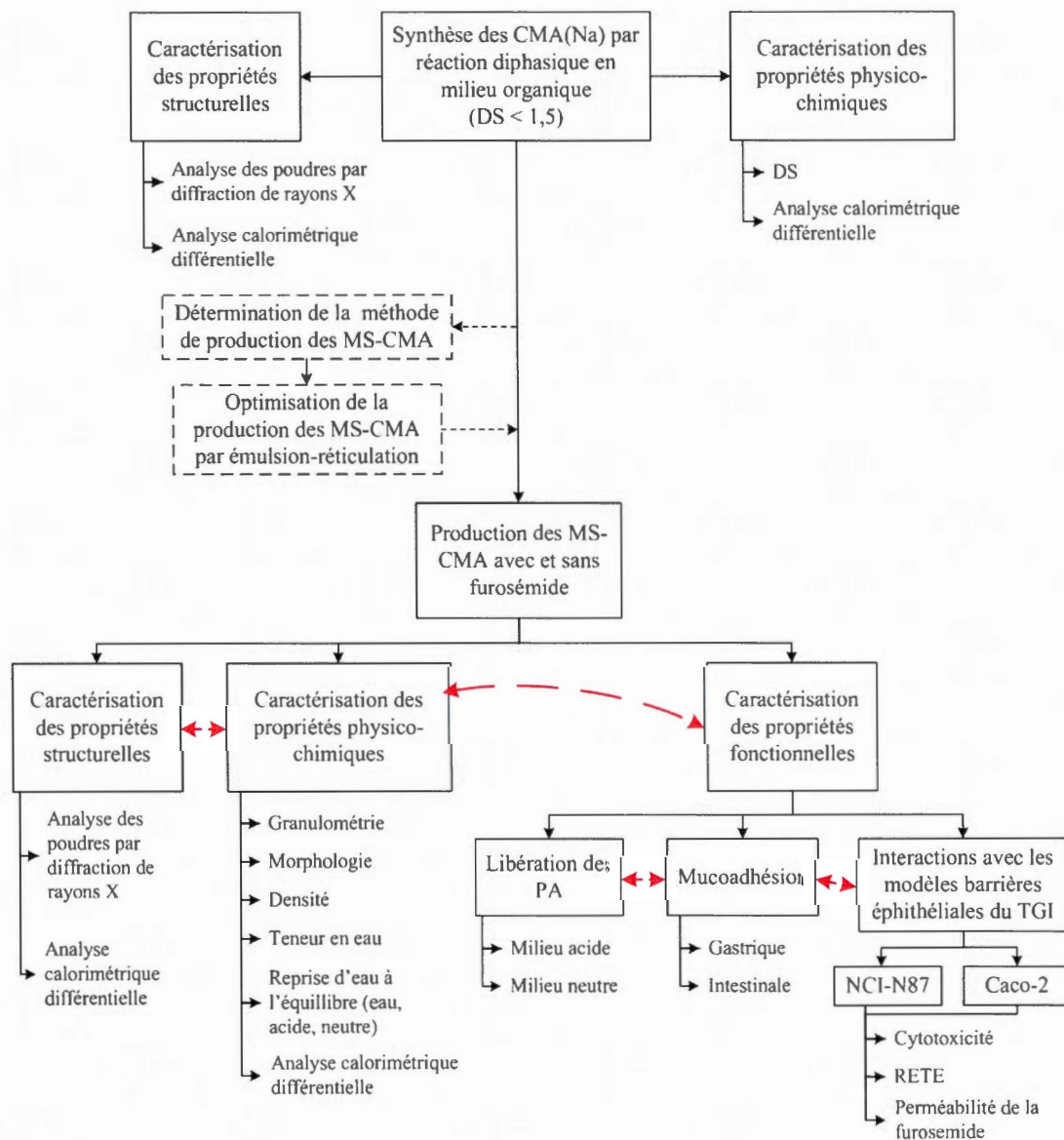


Figure 4.3 Représentation schématique de l'approche méthodologique développée et utilisée pour étudier l'influence du DS des CMA pour l'élaboration des MS-CMA (chapitre VIII).

La caractérisation des propriétés physico-chimiques se réfère tout d'abord à la quantification du DS des CMA au moyen d'une méthode de titrage inverse (Stojanovic *et al.*, 2005). Suivant la détermination des valeurs de DS, la caractérisation des propriétés physico-chimiques se rapporte à la caractérisation des propriétés intensives et extensives des CMA et des formulations à base de CMA connus pour avoir des influences potentielles sur les propriétés des formulations, par exemple la granulométrie, la densité et la solubilité relative des poudres de CMA ainsi que la dureté des comprimés, les dimensions, la compatibilité des CMA avec les PA modèles (par CDB) et la reprise d'eau à l'équilibre (gonflement) des formulations. Les méthodes utilisées pour caractériser les propriétés physico-chimiques correspondaient, pour la grande majorité, à des méthodes définies dans la littérature scientifique, plus particulièrement, dans la Pharmacopée américaine (US Pharmacopeial Convention, 2012).

Il est également possible d'observer sur les figures 4.1 à 4.3 que la caractérisation des propriétés fonctionnelles a uniquement été effectuée sur les formulations à base de CMA. Ceci s'explique par le fait que les fonctionnalités ou les performances d'un excipient peuvent être évaluées de façon appropriée exclusivement dans le contexte d'une forme pharmaceutique et de conditions environnantes définies (Moreton, 2010a). Ainsi, dans le cas des comprimés monolithiques à base de CMA (figures 4.1 et 4.2), les fonctionnalités des CMA ont été évaluées par la caractérisation des profils de libération *in vitro* des médicaments dans des conditions reproduisant celles existantes dans le TGI. La reproduction de ces conditions a été réalisée au moyen de différents milieux de dissolution, soit le FGS (pH 1,2), le FIS (pH 6,8) ou le FIS_{Pan} (pH 6,8), où la composition de ces milieux de dissolution est spécifiée dans la Pharmacopée américaine (US Pharmacopeial Convention, 2012). À partir de ces profils de dissolution et en utilisant des modèles présentés à la section 2.2.2, il a été possible d'évaluer et de quantifier, sur une base semi-empirique, les mécanismes gouvernant la libération de l'acétaminophène à partir des comprimés de CMA.

Cette caractérisation des profils de libération dans différents milieux de dissolution a également été réalisée pour les MS-CMA chargées de furosémide. De plus, les propriétés fonctionnelles des MS-CMA ont été évaluées en termes de mucoadhésion et d'interactions

avec des modèles *in vitro* des barrières épithéliales du TGI. Puisqu'il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode standardisée pour quantifier les propriétés mucoadhésives des formes pharmaceutiques solides, une méthode expérimentale utilisant des sections fraîches d'estomac et d'intestin de porc a été développée au cours de la réalisation de l'article pour évaluer de façon comparative les propriétés mucoadhésives des différentes MS-CMA et des contrôles. Cette méthode était basée sur la capacité de rétention des microsphères à la surface des muqueuses gastriques et intestinales immergées respectivement dans un milieu acide ou neutre (à 37 °C) et soumises à une contrainte de cisaillement (agitation). Tout d'abord, la caractérisation des interactions entre les MS-CMA et les modèles des barrières épithéliales du TGI se veut une confirmation de l'innocuité des microsphères par l'étude de la viabilité des cellules cultivées en monocouche sur des filtres qui ont été mises en contact avec les MS-CMA pour une période de temps donnée. Par la suite, similairement à l'étude de viabilité, la capacité des MS-CMA à modifier l'imperméabilité des monocouches de cellules (ouverture des jonctions serrées) a été évaluée par la quantification de l'évolution de la RETE des monocouches de cellules en présence des MS-CMA et des contrôles à leur surface. Finalement, la capacité des MS-CMA à modifier l'absorption de la furosémide a été évaluée par la quantification, sous différents gradients de pH, de la perméabilité transépithéliale de la furosémide libérée à partir des MS-CMA placées à la surface des monocouches de cellules. Ces expérimentations, qui ont servi à caractériser les interactions des MS-CMA avec des barrières épithéliales du TGI ont été réalisées au moyen des lignées cellulaires épithéliales humaines gastrique NCI-N87 (CRL-5822) et intestinale Caco-2 (HTB-73). Cette dernière lignée est couramment et abondamment utilisée dans l'industrie pharmaceutique et des biotechnologies pour quantifier la perméabilité intestinal des PA, à l'opposé de l'utilisation de la première lignée pour caractériser les propriétés des PA ou des formulations solides qui a été développée au cours de cette thèse.

La figure 4.4 présente un résumé schématique de l'approche méthodologique qui a servi à établir la possibilité d'utiliser la lignée cellulaire NCI-N87 cultivée sur des filtres comme modèles *in vitro* de la barrière épithéliale gastrique pour évaluer la perméabilité gastrique des PA. Cette approche méthodologique se veut une approche dite séquentielle, *i.e.* que la réalisation de chaque étape permet de définir les conditions ainsi que les limites

d'expérimentation pour les étapes suivantes. Le choix de cette lignée cellulaire se justifie par le fait qu'il a été déterminé, suite à une revue de la littérature scientifique traitant des cellules épithéliales gastriques, que les cellules NCI-N87 étaient probablement la lignée cellulaire la plus appropriée pour cette application spécifique, car elles possédaient des caractéristiques pertinentes et uniques vis-à-vis d'autres lignées cellulaires gastriques communes (section 1.4.1). De plus, cette lignée est accessible à l'ensemble de la communauté scientifique via l'« *American Type Culture Collections (ATCC)* ».

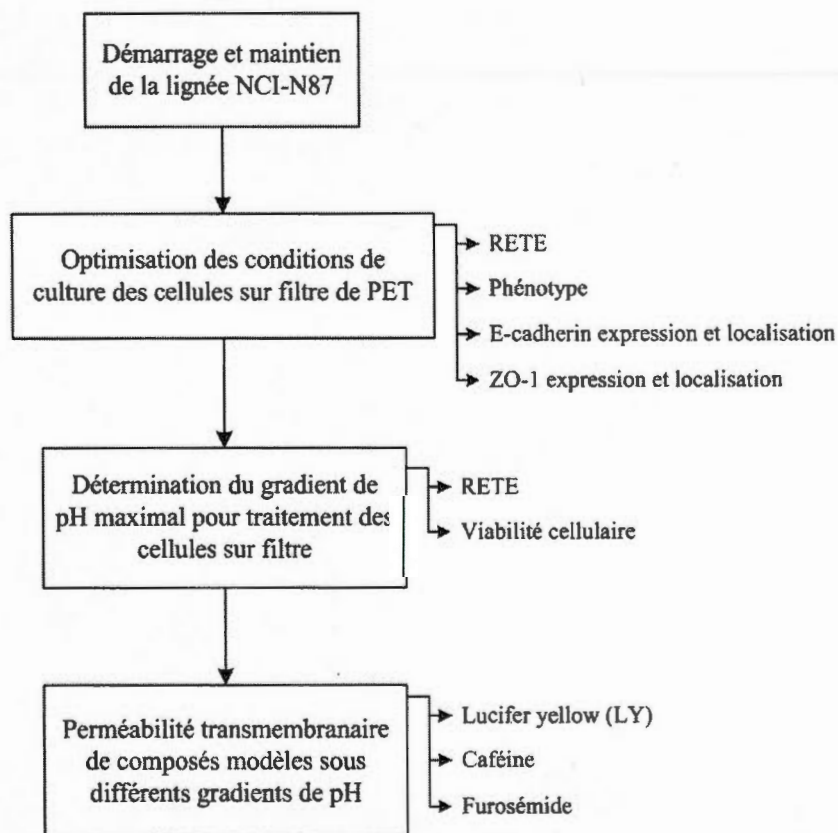


Figure 4.4 Représentation schématique de l'approche méthodologique développée et utilisée pour déterminer la faisabilité d'utiliser la lignée cellulaire NCI-N87 comme modèle *in vitro* de la barrière épithéliale gastrique (chapitre VIII).

Le point de départ de l'approche méthodologique de l'article portant sur les cellules NCI-N87 (figure 4.4) a été le démarrage et le maintien des cultures de ladite lignée NCI-N87 sous des conditions standards recommandées par le fournisseur (ATCC, 2007). À la suite de quelques passages où les cellules ont présenté un phénotype stable, une optimisation des conditions de cultures des cellules NCI-N87 cultivées sur des filtres de PET a été réalisée afin de maximiser la RETE des monocouches de cellules. Pour ce faire, la densité initiale d'ensemencement des cellules sur les filtres a été variée conjointement à l'utilisation de différents milieux de culture. Ces milieux de culture se différencient par le type de milieu servant de base au milieu complet de culture soit le « *Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI-1640)* », le « *Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)* » ou le « *Dulbecco's modified Eagle's medium : Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)* ». La sélection de ces milieux s'explique par le fait qu'ils ont tous été utilisés lors de réalisation d'études avec des monocouches de cellules NCI-N87 (Basque *et al.*, 2001 ; Chailler et Ménard, 2005 ; Jung *et al.*, 2006), mais pour lesquelles il n'était pas possible d'établir distinctement le milieu le plus approprié dû aux grandes différences entre les résultats obtenus. Une fois les conditions optimales de culture des monocouches de cellules NCI-N87 établies, l'expression et la localisation des protéines E-cadherine et ZO-1 ont été vérifiées par immunofluorescence. Un essai de quantification de l'évolution de l'expression de ces protéines fut également effectué par immunobuvardage de type Western (figure A.1).

Toujours sous les conditions optimales de culture, la résistance des monocouches de cellules NCI-N87 à des conditions simulant celles existantes dans l'estomac humain a été par la suite vérifiée au moyen de traitements des cellules pour une période temps donnée avec différents gradients de pH entre les compartiments apicaux (pH de 1,0 à 7,4) et basolatéraux (pH 7,4). La résistance des monocouches de cellules NCI-N87 a été quantifiée en termes de l'évolution de la RETE au cours des traitements ainsi que, supplémentairement, de la viabilité des cellules suite à ces traitements (figure A. 2). L'intégrité des monocouches de cellules sous les conditions limites de gradient de pH a été confirmée subséquemment au moyen du marqueur d'imperméabilité « *Lucifer Yellow (LY)* ». Finalement, la perméabilité transépithéliale de la caféine et de la furosémide (PA modèles) sous les conditions limites de gradient de pH préalablement établies a été quantifiée selon une méthode identique à celle utilisée avec les

cellules Caco-2 (Hubatsch, Ragnarsson et Artursson, 2007). Ces composés modèles furent choisis dans le cadre de cette étude, car il était rapporté dans la littérature que ces PA peuvent être absorbés dans l'estomac (Eteng *et al.*, 1997 ; Klausner *et al.*, 2003) et qu'ils possédaient des propriétés opposées de perméabilité, soit respectivement une grande et une très faible perméabilité transépithéliale. Il est de plus intéressant de noter que l'utilisation de ces PA est suggérée par les agences réglementaires pour établir la validité d'une méthode d'évaluation de perméabilité transépithéliale des médicaments (US Department of Health and Human Services, 2000).

4.5.1 Développement et optimisation de la synthèse des carboxyméthyl amidon par réaction diphasique en milieu organique

L'approche méthodologique présentée à la figure 4.2 montre qu'il a été possible de réaliser l'étude de l'augmentation du DS sur les propriétés des CMA utilisés comme excipient au moyen d'un processus préalable de développement et d'optimisation d'une méthode de synthèse des CMA par réaction diphasique en milieu organique. L'utilisation d'une seconde méthode de synthèse pour la réalisation de cette étude fut nécessaire afin d'obtenir des CMA possédant des DS élevés tout en conservant une efficacité de réaction (ER) satisfaisante d'un point de vue industriel. Parmi les différentes méthodes de synthèse des CMA présentées à la section 3.3.3, la méthode de synthèse diphasique en milieu organique est la seule qui permet de rencontrer ces critères. En effet, la méthode de synthèse en milieu aqueux est limitée à l'obtention de CMA ayant de faible DS ($< 0,3$) avec de faible ER ($< 40\%$) (Heinze et Koschella, 2005). La méthode de synthèse assistée par micro-onde permet d'obtenir une meilleure ER (jusqu'à 60%), mais pour laquelle les valeurs de DS demeurent faibles ($< 0,4$) (Singh *et al.*, 2011). La méthode de synthèse par procédé sec, permet d'obtenir des valeurs de DS élevés (jusqu'à $0,7$) (Parvathy *et al.*, 2005), produit des CMA de mauvaise apparence (jaunâtre, brunâtre) (Li, Mujiyambere et Liu, 2011). Or, cette dernière caractéristique est peu compatible avec celles désirées par l'industrie pharmaceutique (tableau 2.3).

La figure 4.5 présente le montage expérimental qui a été utilisé pour la synthèse des CMA en milieu organique ainsi que les conditions standards de réaction (masse de Hylon VII sec : $M_{ARA,sec}$; masse de NaOH : M_{NaOH} ; vitesse d'agitation : ω ; puissance d'agitation : P ; temps de

carboxyméthylation : t; acide acétique pour l'arrêt de la réaction : CH_3COOH). Ces conditions standards ont été fixées à partir de données disponibles dans la littérature, qui traitait également de l'optimisation de la carboxyméthylation d'une variété de type d'amidons (exemple Kwon *et al.*, 1997 ; Tijssen *et al.*, 1999 ; Volkert *et al.*, 2004). Les paramètres de synthèse qui ont été modifiés au cours de cette étude d'optimisation sont le milieu réactionnel (solvant organique et proportion d'eau), le temps de prétraitement des particules de Hylon VII au NaOH (t_{NaOH}), la charge en solide et la température de réaction (T). Les résultats obtenus à la suite de différentes synthèses sont présentés dans le tableau 4.1. Les DS et les ER ont été déterminés selon les procédures décrites à la section 6.2.4.3. Les premiers essais (1 à 3), réalisés en mode discontinu (« batch »), avaient pour but de déterminer l'influence de l'augmentation du ratio molaire de MCANa/UG dans un milieu composé de 2-propanol/eau 90/10 w/w, où il a été trouvé que le DS augmentait avec la valeur de MCANa/UG et que la ER demeurait de l'ordre de 48 %. Les essais suivants (4 à 6) ont montré que l'ajout d'un temps de prétraitement des particules de Hylon VII au NaOH avant l'ajout du MCANa (mode semi-discontinu) permettait d'augmenter perceptiblement les valeurs de DS et d'ER (supérieur à 50%). Cette augmentation des valeurs de DS des CMA et d'ER est probablement induite par un gonflement supérieur et plus uniforme des particules d'amidon dans le milieu réactionnel résultant de l'alcalinisation des groupes hydroxyles par le NaOH, voir l'équation (3.1), qui facilitait la diffusion des réactifs à l'intérieur des particules d'amidon. L'augmentation du ratio MCANa/UG à une valeur de 2,5/1,0 (essai 7) a provoqué l'agglomération des CMA en une masse gélatineuse et collante à l'intérieur du réacteur, ce qui a causé *de facto* l'arrêt de la synthèse. Cette agglomération des polymères a également été obtenue (à partir des paramètres de l'essai 6), lors de l'augmentation de T à 50 °C (essai 8), de l'augmentation de la charge en solide à 15 % (essai 9), de l'augmentation de la proportion d'eau à 12,5 % dans le milieu réactionnel et de T à 45 °C (essai 12), de l'augmentation de la proportion d'eau à 15 % (essai 13) et lors du remplacement du 2-propanol par de l'éthanol (essai 14). Ce phénomène d'agglomération est un problème fréquent lors de la synthèse de CMA hautement substitués et est provoqué par la gélatinisation partielle des particules d'amidon dans le milieu réactionnel (Sangseethong, Ketsilp et Sriroth, 2005 ; Volkert *et al.*, 2004). Ces essais démontrent l'importance du contrôle des paramètres lors de la synthèse des CMA hautement substitués. Les essais 15 et 16 ont confirmé la justesse de la sélection du 2-

propanol comme solvant organique composant la base du milieu réactionnel puisque son remplacement avec du méthanol ou de l'acétone diminuait considérablement les valeurs de DS et d'ER. Cette diminution est probablement attribuable à un gonflement réduit des particules dans ces milieux réactionnels.

Finalement, l'essai 11 a montré que l'augmentation de la proportion d'eau à 12,5 % dans le milieu réactionnel permettait d'obtenir les valeurs de DS et d'ER maximales. Toutefois, les paramètres de réaction de l'essai 11 ont été jugés trop près de ceux pouvant engendrer l'agglomération des particules de CMA et ainsi, les paramètres de l'essai 6 ont été choisis pour réaliser l'étude sur l'augmentation de la valeur du DS sur les propriétés des CMA utilisés comme excipient. Lors de cette étude, les autres CMA possédant des DS inférieurs ont été obtenus en utilisant les mêmes paramètres de synthèse, mais en diminuant le ratio molaire MCANa/UG. De plus, un CMA avec un DS supérieur (1,74) a été obtenu au moyen de deux carboxyméthylations successives, où la seconde réaction a été réalisée selon les conditions de l'essai 10.

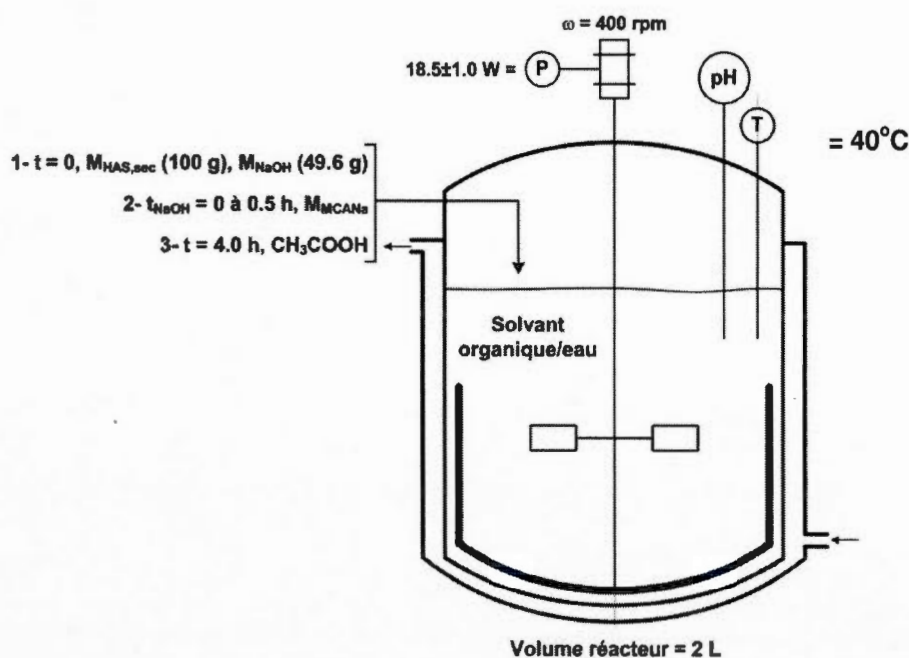


Figure 4.5 Montage expérimental utilisé pour la synthèse des CMA par réaction diphasique en milieu organique et conditions standard de réaction.

Tableau 4.1 Optimisation de la synthèse des CMA à partir de Hylon VII par réaction diphasique en milieu organique. Influence du milieu réactionnel, du ratio molaire NaMCA/NaOH/UG, de la charge en solide, de la température de réaction (T) et du temps de prétraitement au NaOH (t_{NaOH}) sur le DS des CMA et l'efficacité de la réaction (ER) de carboxyméthylation.

#	Milieu réactionnel	Ratio molaire MCANa/NaOH/UG	Charge solide (%)	T (°C)	t_{NaOH} (h)	DS	ER (%)
1	2-propanol/eau 90/10 w/w	1,5/2,0/1,0	10	40	0,0	0,71	47,3
2	2-propanol/eau 90/10 w/w	1,75/2,0/1,0	10	40	0,0	0,84	48,0
3	2-propanol/eau 90/10 w/w	2,0/2,0/1,0	10	40	0,0	0,97	48,5
4	2-propanol/eau 90/10 w/w	1,5/2,0/1,0	10	40	0,5	0,89	59,3
5	2-propanol/eau 90/10 w/w	1,75/2,0/1,0	10	40	0,5	1,11	63,4
6	2-propanol/eau 90/10 w/w	2,0/2,0/1,0	10	40	0,5	1,23	61,5
7	2-propanol/eau 90/10 w/w	2,5/2,0/1,0	10	40	0,5	Agglomération	
8	2-propanol/eau 90/10 w/w	2,0/2,0/1,0	10	50	0,5	Agglomération	
9	2-propanol/eau 90/10 w/w	2,0/2,0/1,0	15	40	0,5	Agglomération	
10	2-propanol/eau 95/5 w/w	2,0/2,0/1,0	10	40	0,5	0,74	37,0
11	2-propanol/eau 87,5/12,5 w/w	2,0/2,0/1,0	10	40	0,5	1,34	67,0
12	2-propanol/eau 87,5/12,5 w/w	2,0/2,0/1,0	10	45	0,5	Agglomération	
13	2-propanol/eau 85/15 w/w	2,0/2,0/1,0	10	40	0,5	Agglomération	
14	Éthanol/eau 90/10 w/w	2,0/2,0/1,0	10	40	0,5	Agglomération	
15	Méthanol/eau 90/10 w/w	2,0/2,0/1,0	10	40	0,5	0,43	21,5
16	Acétone/eau 90/10 w/w	2,0/2,0/1,0	10	40	0,5	0,31	15,5

4.5.2 Détermination et optimisation de la méthode de production des microsphères de carboxyméthyl amidon

La production de microsphères à partir des amidons ou des dérivés d'amidon peut s'effectuer selon plusieurs méthodes. Lors de la réalisation de l'article étudiant les propriétés des MS-CMA, des essais ont été réalisés afin de déterminer quelle méthode était la plus appropriée pour produire les microsphères et par la suite, optimiser la méthode de production choisie. Cette étape de développement et d'optimisation des méthodes a été effectuée au moyen de CMA possédant un DS de 1,0, dû à la plus grande disponibilité de ce polymère au moment de la réalisation des différents essais. Les méthodes de production qui ont tout d'abord été mises à l'épreuve sont le séchage par atomisation (Desai, 2005, 2007), l'extrusion-sphéronisation (Trivedi *et al.*, 2007), la gélification ionotropique (Jha et Bhattacharya, 2008 ; Ma *et al.*, 2008) et l'émulsion-solvant évaporation (Arshady, 1990 ; Tuovinen *et al.*, 2004a ; Tuovinen *et al.*, 2004b). Ces différentes méthodes ont permis la production de MS-CMA dont les diamètres variaient de 10 à 1000 μm , mais qui étaient caractérisées par une solubilisation presque instantanée lorsqu'immergées dans l'eau ou dans les milieux de dissolution (FGS, FIS). Cette caractéristique était donc incompatible avec l'administration de ces microsphères mucoadhésives par voie orale.

La production des MS-CMA a ensuite été réalisée au moyen d'une méthode d'émulsion-réticulation avec le trimétaphosphate de sodium (STMP) comme agent de réticulation (Figure 3.7), qui est un sel de faible toxicité, sans effet néfaste connu chez l'homme (Fang *et al.*, 2008) et permettant de réticuler uniformément les amidons (Le Bail, Morin et Marchessault, 1999). L'emploi de la réticulation des chaînes de CMA permettait aux microsphères de conserver leur intégrité physique lorsqu'immergées dans les milieux de dissolution (figure 4.6). Cette méthode de production a donc été sélectionnée pour produire les MS-CMA au moyen d'un montage expérimental similaire à celui utilisé pour la synthèse des CMA (figure 4.5) selon le protocole décrit à la section 8.2.5.3 et les paramètres de production standards présentés dans le tableau 4.2.

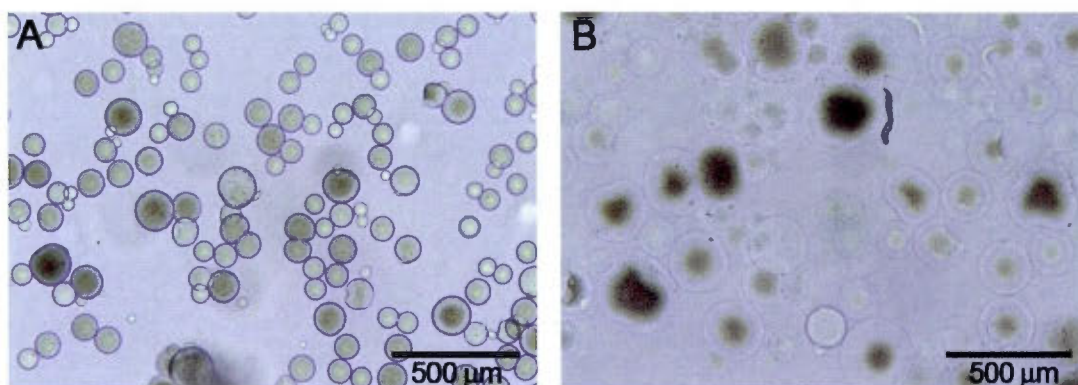


Figure 4.6 Gonflement des MS-CMA DS 1,0 produits par émulsion-réticulation dans (A) le FGS après 10 min et (B) le FIS après 1 min.

Tableau 4.2 Paramètres de production standard et variés lors de l'optimisation de la production des MS-CMA par émulsion-réticulation

Paramètres de production standard	Valeurs
M_{CMA} (g)	5,0
M_{NaOH} (g)	1,04
M_{STMP} (g)	2,0
V_{aq} (mL)	31,0
V_{org} (mL)	375,0
t_{MS-CMA} (h)	4,0
Surfactant	Span 80
Agitateur	Rushton
Réacteur	1 L avec 1 chicane
Paramètres de production variés	Valeurs
Phase huileuse	PEG 10 00 (25 % w/w), paraffine liquide, Cyclohexane/chloroforme 80/20 v/v
Concentration surfactant (% v/v)	0 à 1,0
T (°C)	30 à 50
ω (rpm)	600 à 1800

Dans le cadre de l'étude sur les MS-CMA, il était désiré d'obtenir des microsphères sphériques possédant le plus faible diamètre afin de maximiser leur surface spécifique, tout en conservant des propriétés de contrôle de libération de la furosémide (PA modèle). Pour ce faire, des expérimentations de production des microsphères par émulsion-réticulation ont été réalisées, où certains paramètres de production ont été variés (tableau 4.2). Il a été rapidement déterminé que le mélange de cyclohexane/chloroforme 80/20 v/v était la phase huileuse la plus appropriée pour produire les MS-CMA. En effet, la production des microsphères dans une phase huileuse composée d'une solution aqueuse de polyéthylène glycol (PEG) 10 000 ou de paraffine liquide résultait invariablement en l'agglomération des microsphères lors de leur extraction suivant l'émulsion-réticulation (figure 4.7f). Les mécanismes qui engendraient cette agglomération n'ont pas été étudiés en détails, mais sont probablement associés au fort pouvoir cohésif des CMA hautement substitués interdépendant avec la teneur en eau ainsi que les tensions de surface entre les microsphères et la phase huileuse. L'utilisation de l'une ou l'autre de ces phases huileuses était souhaitable afin d'éviter l'emploi de solvant organique pouvant avoir des influences néfastes sur la santé et dont les quantités résiduelles dans les formulations sont grandement limitées par réglementation (chloroforme < 60 ppm, cyclohexane < 3880 ppm (ICH, 2011)).

Parmi les autres paramètres de production variés (tableau 4.2) soit la température (T), la phase huileuse, la concentration de surfactant dans la phase huileuse et la vitesse d'agitation de la turbine Rushton (ω), il a été trouvé que seuls les deux derniers paramètres avaient une influence significative sur la taille et la morphologie des microsphères. La concentration de surfactant contrôlait l'ordre de grandeur du diamètre moyen ($D_{3,2}$) des microsphères où, avec une concentration de 0, 0,1 et 1,0 % v/v de Span 80 ($\omega = 600$ rpm), des MS-CMA ayant un $D_{3,2}$ respectivement de 288, 91 et 14 μm (figure 4.7 a, c et e) ont été produites. De plus, les microsphères produites sans la présence de surfactant présentaient une morphologie et une surface irrégulière (figure 4.7 a, et b), résultant probablement de la contraction des microsphères lors de leur nettoyage et de leur purification au 2-propanol, contrairement aux microsphères produites en présence de surfactant (figure 4.7 c à e). L'augmentation de la valeur de ω diminuait quant à elle modérément le $D_{3,2}$ des MS-CMA. Sans la présence de surfactant, l'accroissement de la valeur de ω de 600 à 1200 rpm a diminué le $D_{3,2}$ des

microsphères de 57 μm (figure 4.7 a, et b) tandis qu'en présence de 0,1 % de surfactant, l'augmentation de ω de 600 à 1800 rpm a diminué le $D_{3,2}$ des microsphères de 13 μm (figure 4.7 c, et d). En fonction des critères de taille et de sphéricité précédemment mentionnés, les paramètres de production de la figure 4.7c ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, concentration surfactant = 0,1 % et $\omega = 600\text{ rpm}$) ont été sélectionnés pour produire les MS-CMA possédant différents DS.

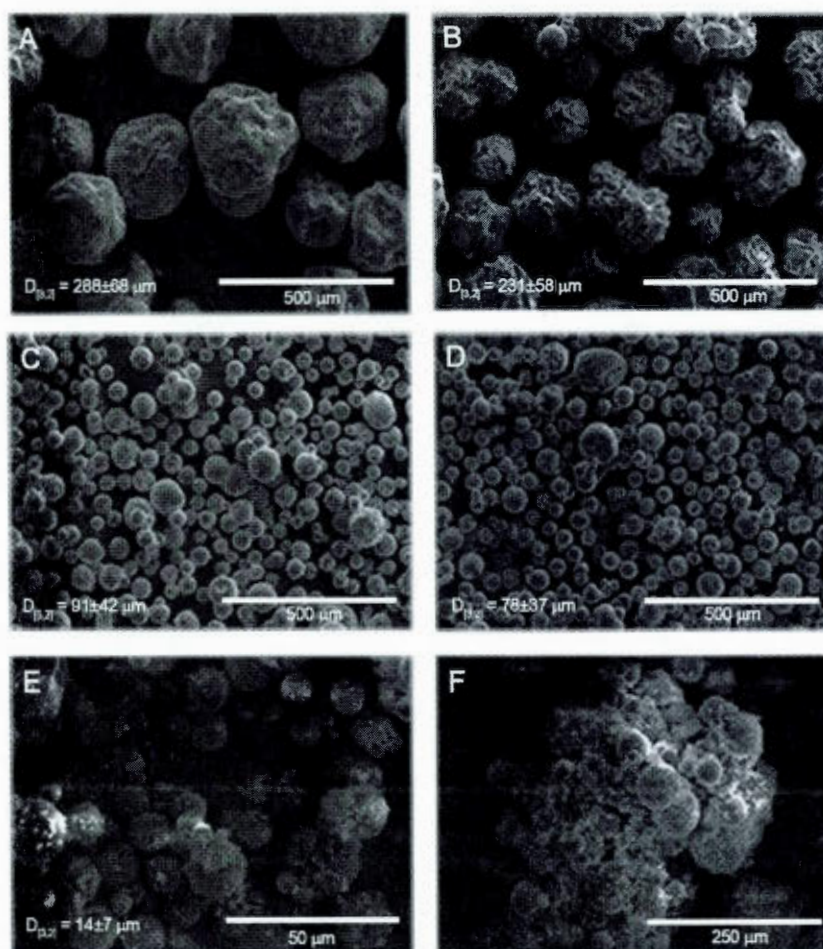


Figure 4.7 Optimisation des paramètres de production des MS-CMA obtenues par émulsion-réticulation. MS-CMA DS 1,0 produites tel que décrit dans la section 8.2.5.3 à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ et selon les paramètres suivants: (A) Span 80 0 %, $\omega = 600\text{ rpm}$, (B) Span 80 0 %, $\omega = 1800\text{ rpm}$, (C) Span 80 0,1 %, $\omega = 600\text{ rpm}$, (D) Span 80 0,1 %, $\omega = 1200\text{ rpm}$, (E) Span 80 1,0 %, $\omega = 600\text{ rpm}$ et (F) Span 80 0,1 %, $\omega = 600\text{ rpm}$ (émulsion-réticulation réalisée dans l'huile de paraffine).

CHAPITRE V

INFLUENCE DES MÉTHODES DE SÉCHAGE ET DE FAIBLES DEGRÉS DE SUBSTITUTION SUR LA STRUCTURE ET LES PROPRIÉTÉS DE LIBÉRATION DE MÉDICAMENT DU CARBOXYMÉTHYL AMIDON

5.1 Présentation de l'article 1

Le manuscrit présenté dans ce chapitre s'inscrit dans une continuation des travaux de recherche portant sur les CMA faiblement substitués de même que d'autres dérivés d'amidon (CMA réticulés et amidons réticulés) effectués au cours des dernières années dans le laboratoire des biomatériaux du Pr Mateescu (UQAM). La motivation première de ce manuscrit était de vérifier l'influence de différentes méthodes de séchage des CMA sur les propriétés physico-chimiques et de libération de médicaments. La méthode usuelle pour produire les CMA à l'échelle du laboratoire était la précipitation et le séchage par solvant organique (PS) (par exemple l'acétone, l'éthanol ou le méthanol). Toutefois, cette méthode de séchage est très peu envisageable pour une production des CMA à une échelle industrielle pour des raisons économiques et de sécurité, ce qui justifie l'emploi d'autres méthodes de séchage telles que le séchage par atomisation (SA) ou la lyophilisation (Ly) (séchage à froid) étudiées lors de cette étude. La seconde motivation de cet article résidait dans le fait que certaines interrogations demeuraient au niveau de l'influence directe des CMA sur les propriétés de libération de médicaments lorsqu'ils sont formulés sous forme de comprimés monolithiques vis-à-vis de l'influence des propriétés physiques des comprimés et l'influence des propriétés des principes actifs modèles (par exemple la teneur ou la solubilité) en fonction du milieu de dissolution. Cette motivation a justifié l'emploi d'un seul principe actif

modèle, l'acétaminophène, au cours de cette étude dont la bonne solubilité aqueuse et les charges des molécules sont peu influencées par le pH et la force ionique du milieu de dissolution.

L'hypothèse de recherche posée pour répondre à ces motivations était que les différentes méthodes de séchage nommées ci-dessus (PS, SA et Ly) sont régies par différents mécanismes de transfert de matière et de chaleur. Ces différents mécanismes pourraient avoir des influences variées sur les propriétés structurales et physico-chimiques des CMA sous forme de poudre ainsi que sur les propriétés de libération de médicament résultantes lorsque les CMA sont formulés sous forme de comprimés monolithiques chargés avec de l'acétaminophène.

Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai produit des CMA faiblement substitués à partir d'ARA (Hylon VII) carboxylé en milieu aqueux au moyen d'AMCA. Ces CMA ont été séchés par PS et subséquemment par SA ainsi que par Ly en utilisant des paramètres opératoires préalablement établis. J'ai caractérisé les propriétés structurales et physico-chimiques des poudres de CMA ainsi obtenues ainsi que les propriétés physiques et de libération de médicaments de ces CMA formulés sous forme de comprimés monolithiques. Les résultats obtenus furent communiqués au moyen de l'article présenté dans ce chapitre ainsi que de diverses communications par affiche.

Le sujet de ce manuscrit fut proposé par le Pr Mateescu qui, par la suite avec le Dr Gosselin, ont suivi l'évolution des expérimentations et des résultats obtenus, fourni une assistance technique sur l'élaboration du manuscrit et révisé le manuscrit.

5.2 Influence of drying procedure and of low degree of substitution on the structural and drug release properties of carboxymethyl starch

Marc Lemieux¹, Patrick Gosselin², Mircea Alexandru Mateescu^{1,*}

¹ Department of Chemistry and Centre Pharmaqam, Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec), Canada, H3C 3P8

² Corealis Pharma Inc., 141 President-Kennedy, suite SB-6520, Montréal (Québec), Canada,
H2X 3Y7

* Corresponding author: Mircea Alexandru Mateescu

Department of Chemistry,
Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec), Canada, H3C 3P8
Phone: +1 514 987 4319,
Fax: +1 514 987 4054.
E-mail address: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Article publié dans « AAPS PharmSciTech », 2010, vol. 11, p. 775-785.

5.2.1 Résumé

L'objectif de cette étude était d'étudier l'influence de méthodes de séchage et de faibles degrés de substitution (DS) sur les propriétés structurales, physico-chimiques et de libération de médicaments de carboxyméthyl amidon riche en amylose (CMA). Des CMA ayant trois DS de 0,03, 0,14 et 0,25 ont été synthétisés et séchés par précipitation par solvant (PS), par séchage par atomisation (SA) ou par lyophilisation (Ly). Le DS avait une influence sur la structure cristalline des CMA. Il a été trouvé qu'un DS de 0,14 ou plus induisait un changement de polymorphisme. La méthode de séchage et le DS avaient tous les deux un impact sur les propriétés physico-chimiques des poudres de CMA, ce qui peut par la suite influencer les caractéristiques de formulation et les propriétés de libération de médicaments à partir de comprimés monolithiques. Les CMA ayant des DS de 0,14 et de 0,25 séchés par PS ou SA présentaient des propriétés adéquates en termes de compressibilité. Avec l'acétaminophène (20 %) comme modèle, les comprimés monolithiques de CMA ont permis la libération contrôlée du médicament sur une période de plus de 17 h pour le DS de 0,14 et de plus de 10 h pour le DS de 0,25, presque insensiblement au pH, suggérant des propriétés intéressantes pour les applications de libération soutenue.

Mots-clés : Carboxyméthyl amidon, précipitation par solvant, séchage par atomisation, lyophilisation, libération contrôlée

5.2.2 Abstract

The aim of this study was to investigate the influence of drying methods and low range of degrees of substitution (DS) on the structural, physico-chemical and drug-release properties of carboxymethyl high amylose starch (CMS). CMS with three DS of 0.03, 0.14 and 0.25 was synthesized and dried by either solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly). DS had an influence on the crystalline structure of CMS. It was found that a DS of 0.14 or higher induced a modification of polymorphism. The drying method and the DS had both an impact on the physical properties of the CMS powder which can further influence the formulation characteristics and drug-release properties from monolithic tablets. The CMS with DS of 0.14 and 0.25 dried by SP or SD presented good excipient properties in terms of compressibility. With acetaminophen (20%) as tracer, the monolithic CMS tablets showed controlled drug release over 17 h for DS of 0.14 and 10 h for DS of 0.25, almost independent of pH, suggesting interesting properties for sustained release applications.

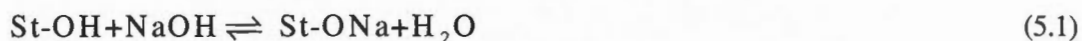
Keywords: Carboxymethyl starch, solvent precipitation, spray drying, lyophilisation, controlled delivery

5.2.3 Introduction

Hydrophilic polymers, swellable or gel forming matrices, are largely used as excipient for oral formulations affording controlled drug delivery (Siepmann et Peppas, 2000). The dissolution kinetics and mechanisms of drug release from a hydrophilic matrix can be adjusted by tailoring factors that govern gel-layer formation, gel network structure and resulting characteristics such as water penetration, polymer swelling, drug dissolution and diffusion, and matrix erosion. All these aspects can be related to the physical and structural properties of the polymer itself, or to polymer chains-chains and polymer chains-dissolution medium interactions (Colombo *et al.*, 2000). Modified starch hydrophilic polymers are advantageous for controlled drug delivery systems due to relatively low cost, accessibility, biocompatibility and good *in vivo* performance (Brouillet, Bataille et Cartilier, 2008). A major factor influencing the starch properties is its crystalline structure (Zobel, 1988b). Depending on source, starch is composed of different ratio of two distinct polysaccharides: amylose, unramified chains of 200 to 2000 glucopyranose units (GU) linked through $\alpha(1-4)$ glucosidic bonds and amylopectin, ramified polymer with sequences of 20-30 GU linked through $\alpha(1-4)$ glucosidic bonds and branching points with $\alpha(1-6)$ glucosidic bonds, for a total of about 3×10^6 GU (Wurzburg, 1986). In native starch, these two polysaccharides can form crystallites in two polymorphic forms, A- and B-type structures, which are based on left-handed double-stranded helices parallel-packed into, respectively, monoclinic and hexagonal cells units, interspersed by amorphous region (Crochet *et al.*, 2005 ; Zobel, 1988b). Crystalline regions inside modified starch can adopt a further polymorphic form, the V-type structure, based on left-handed single-stranded helices close-packed orthorhombically (Zobel, 1988b). V-type structure is generally showing increased gelatinization temperatures, a better dispersibility, a lesser swelling, and a higher solubility in water versus A and B types (Zobel, 1988b).

Carboxymethyl high amylose starch (CMS) was recently introduced as a hydrophilic ionic matrix for oral tablets to control the release of small (Ispas-Szabo *et al.*, 2007) and large (Calinescu *et al.*, 2007) active molecules or bioactive agents (Calinescu et Mateescu, 2008 ; Calinescu *et al.*, 2005). CMS can be synthesized by etherification of the hydroxyl groups (-

OH) with monochloroacetic acid (MCA) or its sodium salt (SMCA) under basic conditions (NaOH) to obtain carboxymethyl groups (CM, $-\text{CH}_2\text{COONa}$) (Heinze et Koschella, 2005), as follows:



The degree of substitution (DS, the average number of CM groups per GU) can vary between 0 and 3 and depends on GU/NaOH/MCA (or SMCA) ratio and reaction yield. After the carboxymethylation in aqueous medium, CMS needs to be precipitated, washed (removal of residual salts) and finally dried. It is known that drying procedures can have an effect on the crystalline structure and physico-chemical properties of solid materials and thus have an impact on subsequent formulations and drug-release characteristics (Brittain *et al.*, 1991 ; Jamzad, Tutunji et Fassihi, 2005 ; Korhonen *et al.*, 2002). The concept of carboxymethylation of starch was first intended to 'add' pH sensitivity to the matrix and thus modulate the drug release throughout the gastrointestinal tract. In dissolution media below the pKa of CMS (approximately 4.2), an additional stabilisation by hydrogen bonding through dimerized carboxylic protonated groups ($-\text{COOH}$) will enhance the strength of the outer gel-layer, thus reducing the drug release rate. Differently, in dissolution media above the pKa, repulsive forces between dissociated carboxylate groups ($-\text{COO}^-$) will reduce the gel-layer strength and increase the drug release rate. It was previously shown that CMS with a DS of 0.3 was more suitable for controlled release than CMS with lower DS (*e.g.*, 0.06) which, often presented a capping during dissolution (Calinescu *et al.*, 2005). On the other hand, dissolution profiles at higher DS (*e.g.*, 0.66) were faster due to higher water penetration in the matrix, particularly in simulated intestinal fluid (SIF). The DS may also have an effect on the physical and crystalline structure of the CMS since hydrogen bonding between the hydroxyl groups of the GU plays an important role in the organization of the starch crystallites. Structural modifications according to the degree of cross-linking have been reflected in the drug release kinetics for the cross-linked high amylose starch (CLHAS) excipient used for controlled release (Ispas-Szabo *et al.*, 1999).

The aim of the study was to investigate the role of drying process and of low range of DS (up to 0.25) on the structural and physical characteristics of CMS powders and on drug-release properties of CMS monolithic tablets. The drying methods evaluated were solvent precipitation (SP), spray drying (SD) and lyophilisation (Ly) (freeze-drying). These procedures were selected since they are common drying and particle generation methods used in the pharmaceutical industry.

5.2.4 Materials and methods

5.2.4.1 Materials

High amylose corn starch (HAS) (Hylon VII) was supplied by National Starch and Chemical Co. (Bridgewater, NJ). Acetaminophen and monochloroacetic acid (MCA) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) as well as the other chemicals were reagent grade and used without further purification.

5.2.4.2 Synthesis of CMS

The CMS were synthesized according to Mulhbachter *et al.* (2001) with slight modifications. Briefly, 100 g of HAS were suspended in 245 mL of H₂O at 50°C in a 2 L jacketed reaction glass vessel (Chemglass, Vineland, NJ) equipped with a servo-controlled speed mixer head (Cole-Palmer Instrument, model 5000-40, Niles, IL) fitted with an anchor agitator to ensure constant and vigorous stirring during the synthesis. Subsequently, 335 mL of preheated 1.5M NaOH solution was added in the medium and stirred for 20 minutes to induce starch gelatinisation and solubilisation. CMS with different DS were synthesised by adding different amounts of MCA, dissolved in minimal volumes of H₂O and added to the medium for a 1 h reaction. Three products were synthesized: CMS1, CMS2 and CMS3 by adding 10, 45 and 70 g of MCA, respectively. As control, non-reacted HAS (hereto called HAS-0) was prepared under the same conditions but without adding MCA to the medium. During the reaction, pH was continuously monitored (Fisher Scientific, model AR20 pH/conductivity meter, Waltham, MA) and maintained between 9.5 ± 0.5 by adding small volumes of 10M NaOH when required. After carboxymethylation, the medium was neutralized at pH 7.0 ± 0.2 with acetic acid (5 M) and cooled to room temperature.

5.2.4.3 CMS purification and drying method

5.2.4.3.1 Solvent precipitation (SP)

Solubilized CMS derivatives (including HAS-0) were extracted from the neutralized reaction medium by solvent precipitation. A volume of 700 mL of an aqueous acetone solution (90% v/v) was slowly added to the CMS solution under continuous and vigorous stirring. After 1 h, the CMS suspensions were vacuum filtered (Büchner with grade 54 cellulose filter paper, Whatman, Kent, UK) and the wet masses were retained and purified by at least four successive re-suspension/vacuum filtration cycles with acetone/water (70% v/v) solution. Purification was continued until the filtrate conductivity was less than 25 $\mu\text{S/m}$ (Fisher Scientific, model AR20 pH/conductivity meter, Waltham, MA) in order to ensure the removal of residual salt ions. Purified wet CMS were then re-suspended twice in acetone for 2 h for dehydration and recovered by vacuum filtration. CMS powder was finally left under vacuum drying (-70 kPa) for 12 hours at room temperature in order to remove residual solvents. The resulting powder was screened over a 300 μm sieve for deagglomeration prior to use.

5.2.4.3.2 Spray drying (SD)

Spray drying (SD) was performed using a mini spray dryer model B-290 (Buchi, Zurich, Switzerland). The CMS and HAS-0 previously obtained and purified by SP were suspended in Nanopure® water, at a concentration of 25 g/L and homogenized (Heidolph, model Diox 600 homogenizer, Kelheim, Germany) at 8000 rpm for 2 min at 25°C. The CMS mixtures were then spray dried using the following operating parameters: 0.5 mm nozzle; 10.0 \pm 0.5 mL/min spray rate; 190 \pm 5°C inlet temperature; 85 \pm 2°C outlet temperature; 470 \pm 50 NL/h atomization flow and 100% air flow (\approx 37m³/h). The resulting powder was screened over a 300 μm sieve for deagglomeration and comparison with powders obtained by other drying methods.

5.2.4.3 Lyophilisation (Ly)

Lyophilisation (Ly) was performed using a Freeze Mobile 24 (Virtis Company Inc., Gardiner, NY). The CMS and HAS-0 previously obtained and purified by SP were suspended and homogenized as described for SD but at a higher concentration (150 g/L). The CMS preparations were separated into 35 mL aliquots, frozen at -80 °C and then dried at -55°C and 0.2 mbar for 48 h. Finally, lyophilised cakes were gently ground with a mortar/pestle and screened over a 300 µm sieve for deagglomeration and comparison with powders obtained by other drying methods.

5.2.4.4 Determination of the degree of substitution (DS)

DS was determined by back titration (Stojanovic *et al.*, 2005) of the protonated form (-COOH) obtained by acid treatment of the polymer and calculated from:

$$DS = \frac{162 \times n_{\text{COOH}}}{m_{\text{dry}} - 58 \times n_{\text{COOH}}} \quad (5.3)$$

Where 162 g/mol is the molar mass of GU, n_{COOH} (mol) is the amount of COOH determined by titration ($n=3$), 58 g/mol is the net increase in the mass of one GU for each CM- group added and m_{dry} is the mass of the dry sample.

5.2.4.5 CMS particles and powder characterization

5.2.4.5.1 X-ray crystallography

X-ray diffraction patterns were obtained with a Siemens D-5000 diffractometer (Munich, Germany) operating in reflectance mode at a Co- K_{α} wavelength (λ) of 1.78897 Å, over an angular range 2θ from 5 to 35° and a scan rate of 2°/min. The recorded diffractograms were smoothed by a local second order polynomial regression (Savitzky-Golay 11-points) using the software GRAMS/AI v7.0 (Thermo Galactic, Waltham, MA). The peak positions were computed according to Bragg's law (Brittain *et al.*, 1991).

5.2.4.5.2 Relative solubility

The relative solubility of CMS and HAS-0 dried with the different methods was determined following Chen and Jane (1994a) and Volkert *et al.* (2004). The method consisted of precise weighing a dry CMS sample (0.2 g) and dissolving it in 10 mL of neutral Nanopure® water at 25°C. The solution was vortexed for 1 min and stored at room temperature for 2 h. The solution was then centrifuged for 15 min at 4000 rpm (IEC, model HN-II centrifuge, Needham, MA) and 5 mL of the supernatant liquid was evaporated in an oven (Blue M, model OV-12A, Blue Island, IL) at 105 °C until a constant mass was reached. The weight of the dry residue was used to calculate the relative solubility of the sample.

5.2.4.5.3 Particle size and size distribution

The granulometry of the particles was determined by optical microscopy using a Leica microscope (model DM2500M, Frankfurt, Germany) interfaced with a color camera (Clemex, model L 2.0C CL-13-211, Longueuil, Canada) and an image analysis software (Clemex Vision PE, Longueuil, Canada). Powder samples were randomly spread on a glass slide to obtain a representative sample. At least 10^5 particles were observed under 200 or 500X magnification and analyzed by digital image analysis. This image processing incorporated gray thresholding and geometric constraints to first differentiate the particles from the background and then to eliminate overlapped or partial particles. Particles were then characterized by their mean size (\bar{D}) and cumulative size distribution (D_{10} , D_{50} and D_{90}), where the size of one particle represents the average value of 64 feret diameters (i.e., distance between two parallel tangents on each side of the particle).

5.2.4.5.4 Particle morphology and surface characteristics

The morphology and surface characteristics of particles were examined with a Hitachi S-4300SE/N variable pressure scanning electron microscope (SEM) (Hitachi High Technologies America, Pleasanton, CA), at 10.0 or 25.0 kV and magnification of 300, 10000 or 25000 X. Samples were prepared on metallic stubs using double-sided conductive tape and then made electrically conductive by gold coating.

5.2.4.5.5 Bulk and tapped densities and powder flow properties

The bulk (ρ_B) and the tapped (ρ_T) densities of the powder were determined with a Vankel tap density tester (Varian Inc., Cary, NC) according to USP method <616> (2012) (n=3). For each sample, the Carr index (CI, also called compressibility index) (Carr, 1965) and the Hausner ratio (HR) (Hausner, 1967) were respectively calculated from eq. (5.4) and (5.5), and interpreted as per USP method <1174> (2012)

$$CI = \frac{(\rho_t - \rho_b)}{\rho_t} \times 100 \quad (5.4)$$

$$HR = \frac{\rho_t}{\rho_b} \quad (5.5)$$

5.2.4.5.6 Thermogravimetric analysis (TGA)

TGA measurements were carried out with a Seiko TG/DTA 200 system (Seiko Instrument Inc., Chiba-shi Chiba, Japan). CMS samples (8 - 12 mg) were heated from 30 to 800°C at 10 °C/min in platinum open crucible under nitrogen flow (200 mL/min) (n=2).

5.2.4.6 CMS tablet characterization

5.2.4.6.1 Tablet preparation

Tablets (500 mg, 12 mm diameter) of CMS and HAS-0 were formulated with acetaminophen (20% drug loading) as drug model, by dry powder blending and direct compression at 24.5 kN (2.5 T-force) using flat faced tooling and a hydraulic press (Carver, model Mini C, Wabash, IN). Tablets were dedusted over a 600 μ m screen.

5.2.4.6.2 Physical characterization of tablets

Crushing strength (hardness) of tablets was determined (n=6) with a Vankel hardness tester (model VK200, Varian Inc., Cary, NC) according to USP method <1217> (2012). Tablet friability was determined (n=2) with a Vankel friabilator (Varian Inc., Cary, NC) according to USP method <1216> (2012). Finally, the thickness of the tablets was measured (n=6) with a digital calliper.

5.2.4.6.3 *In vitro* drug release properties

The dissolution kinetics of CMS tablets ($n=3$) were recorded in USP dissolution apparatus II (Distek 5100, North Brunswick, NJ) at 50 rpm for 2 h in 900 mL pepsin-free simulated gastric fluid (SGF) (pH 1.2) at 37°C and then in pancreatin-free simulated intestinal fluid (SIF) (pH 6.8) until the complete release of the drug. This change of dissolution medium simulated the pH change in the gastrointestinal tract. Acetaminophen (a weak organic acid with pK_a 9.7) was selected as drug model since it is not ionizable at physiological pH values. It also shows minor differences in solubility as a function of pH (*e.g.*, 21.3 mg/mL in pH 1.2, and 17.8 mg/mL in pH 6.8 at 37 °C) (Takahashi *et al.*, 2005). This behaviour limits the influence of drug solubility on the drug release rate. Acetaminophen release profiles were measured by UV spectroscopy at 280 nm (Hewlett-Packard spectrophotometer, model 8452A, Palo Alto, CA).

The drug release mechanism from the CMS tablets was evaluated by the empirical model of Ritger and Peppas (1987):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (5.6)$$

where M_t/M_∞ is the fraction of drug released in time t , k is a kinetic constant incorporating characteristics of the macromolecular network system and n is the release exponent which is indicative of the transport mechanism. The fraction of released drug was fitted, up to $M_t/M_\infty = 0.6$ (60% release), by nonlinear regression of eq. (5.6) using SigmaPlot v. 11 (Systat Software Inc., Chicago, IL) ($R^2 > 0.96$, $p\text{-value} < 0.01$) to determine the values of k and n .

5.2.4.7 Statistical analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) according to drying method and DS for CMS particles (except X-ray diffraction and morphology) and CMS tablets characterization were followed by Bonferroni post-test for individual P values using GraphPad Prism v. 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, California). Statistical significance was assessed for $P < 0.05$.

5.2.5 Results and discussion

5.2.5.1 CMS synthesis

The DS was verified for each CMS derivative after each drying method. The DS of HAS-0 (control), CMS1, CMS2 and of CMS3 were respectively determined as 0.00, 0.03 ± 0.01 , 0.14 ± 0.02 and 0.25 ± 0.02 regardless of the drying method. After solvent precipitation but prior to SD and Ly steps, different types of CMS aqueous systems were observed: suspension-like for HAS-0 and CMS1, opalescent solution for CMS2 and clear solution for CMS3.

5.2.5.2 CMS particles and powder characterization

5.2.5.2.1 X-ray diffraction

Native starch is a semi-crystalline polymer with X-ray pattern characterized by minor diffraction peaks superposed on a large amorphous background (Cairns *et al.*, 1997) (figure 5.1). Since the aim of this study was to investigate the effect of the drying method and the influence of DS on the crystallinity of CMS, only the position of peaks and their relative intensities were considered for discussion.

DS was found to exert a marked effect on the crystalline structure of CMS. Peaks at 15.9, 6.1, 5.2 4.5, 4.0 and 3.7 Å of the native Hylon VII are typical of corn starch containing more than 65% amylose and correspond to the B-type pattern (double stranded helix) (Cheetham et Tao, 1998). Crystallites inside the HAS-0(SP) and CMS1(SP) also presented elements of the B-type pattern with a diffractogram similar but not identical to that of Hylon VII. At higher DS, CMS2 and CMS3 showed a different structure with increased amorphous portion and minor peaks at 7.1 and 4.5 Å characteristic of the V-type pattern (single stranded helix) (Zobel, 1988b).

CMS polymorphism can be correlated with physical and chemical transformations that occurred during gelatinization, carboxymethylation and precipitation steps. During the gelatinization under heat and alkaline conditions, the initial crystalline structure of starch was changed from an ordered state to a disordered state. However, under certain conditions used

in this study, not chemically modified (HAS-0) or slightly modified *i.e.* CMS1 (low DS) can be gelified in its initial B-type pattern (figure 5.1). The carboxymethylation with increased DS was found to induce a different organisation (V-type). Substitution probably induces a disentanglement of the initial B-type pattern of amylose by altering the hydrogen bonding between the hydroxyl groups. Furthermore, disentangled CMS helix chains can, to a certain extent, complex with acetone during the precipitation, favouring the V-type pattern at high DS (0.25). At low DS (0.03) the initial hydrogen bonding was still possible and thus the B-type was still predominant in CMS1(SP). At moderate DS (0.14), the hydrogen bonding is partially altered favouring the V-type pattern as for CMS2(SP) where both B- and V-patterns coexist but with a weak B-type peak at 5.2 Å and V-type 7.1 Å and 4.5 Å peaks of lower relative intensities compared to the CMS3(SP) (figure 5.1). Therefore, a DS of at least 0.14 was sufficient to induce a modification of the polymorphism of CMS synthesized from Hylon VII. Furthermore, increasing DS appears to reduce network self-assembling by hydrogen association between hydroxyl groups and to promote a reorganisation of the network via dimerization of carboxylic groups located at a proper distance (as for CMS3).

Figure 5.1 also shows the crystalline structure of the different CMS as a function of the drying procedure. It was found that drying process did not induce modifications of the peaks positions but influenced their relative intensities. Differences in water content of the CMS as result of different drying methods may explain the variations of the peak intensities where higher water content resulted in higher peak intensities. This aspect is also discussed below in thermogravimetric analysis section. It was previously reported that conversion from the V to B-type pattern can be readily accomplished by hydration (Shiftan *et al.*, 2000 ; Zobel, 1988b). In our case, CMS(SD) and CMS(Ly) powders, differing in moisture content, showed no difference in peak positions. It was therefore assumed that the presence of sufficient CM groups on the GU induced a stabilization of the CMS crystalline structure.

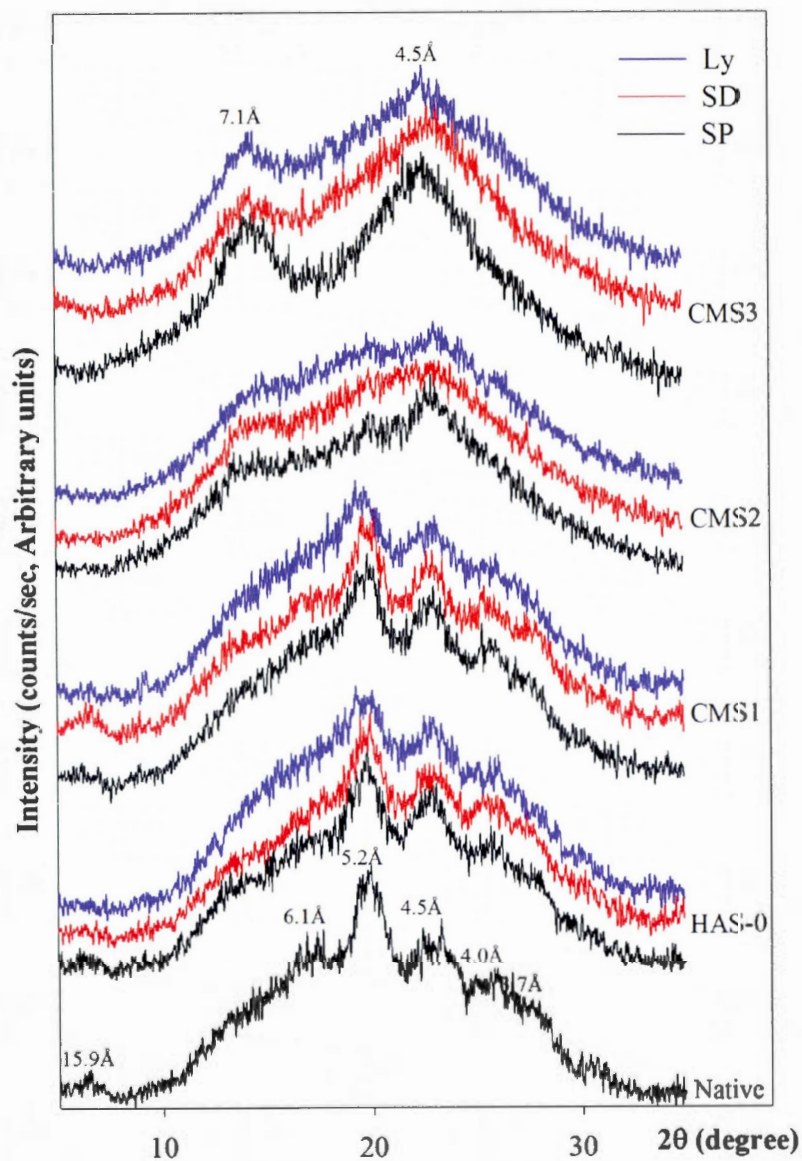


Figure 5.1 X-ray diffractograms of native starch and carboxymethyl high amylose starch (CMS) obtained by solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly) at various degrees of substitution (DS).

5.2.5.2.2 Relative solubility

Substitution of the starch hydroxyl groups with the CM groups induced higher solubility in cold water in function of DS (figure 5.2). The relative solubility of CMS1 (13%) was slightly higher compared to the almost insoluble HAS-0 (4%). Differently, the CMS2 and CMS3 were freely soluble showing the impact of CM groups. The relative solubilities of the CMS were independent of the drying methods. The larger amorphous ratio at increasing DS could also play a role in increased relative solubility due to weaker stabilization by hydrogen association and higher hydrophilicity of carboxylic groups.

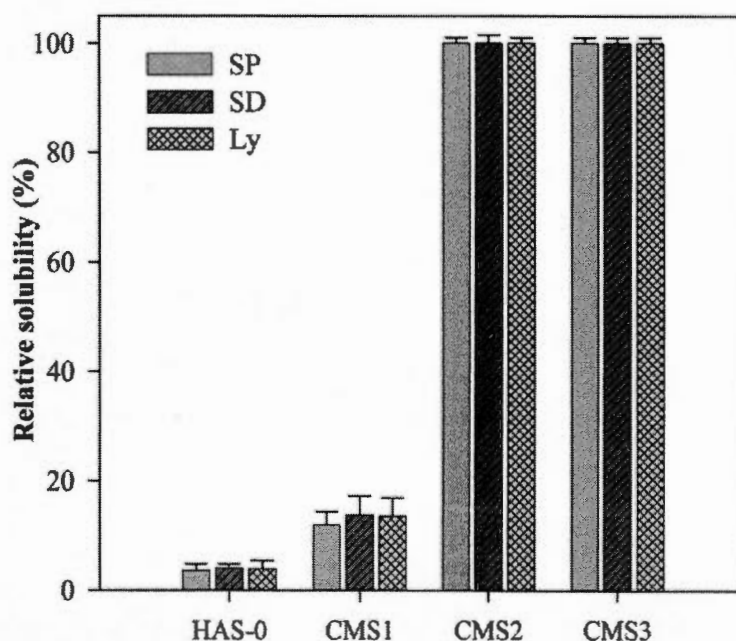


Figure 5.2 Relative solubility (%) of carboxymethyl high amylose starch (CMS) obtained by solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly) at various degrees of substitution (DS) in Nanopure® water (pH 7.0) (n=3).

5.2.5.2.3 Particle size and size distribution

Tableau 5.1 shows a significant decrease of mean size particle \bar{D} with the increase in DS from CMS1 to CMS3 for the SP process. The decrease of particle \bar{D} from 96 to 25 μm was probably caused by a modification of interfacial energy between surface boundaries water-solvent-polymer due to the larger amount of acetone required to induce dehydration and precipitation of polymer chains. Indeed, with increased DS and hydrophilicity of CMS, there is reduction of agglomeration between gelified particles and production of CMS powder with the largest size distributions of particles. The decrease of particle \bar{D} of CMS(SP) particles at higher DS could be also the result of more compaction of the particles due to carboxyl-carboxyl or carboxyl-hydroxyl stabilizations.

For CMS(SD) and CMS(Ly) were typical of the drying process used. It was also found that the DS had no significant influence on the mean size particle \bar{D} and on particle size distribution (figure 5.3). Spray drying produced micronized particles with the narrowest particle size distribution ranging from 2 to 20 μm . The \bar{D} of CMS(Ly) probably depended on the cake grinding which produced particles with similar values compared to CMS(SP) but with a narrower particle size distribution.

5.2.5.2.4 Particle morphology and surface characteristics

Morphology and surface characteristics of CMS (figure 5.3) revealed interesting features in terms of both powder properties and particle formation mechanism. Micrographs of CMS(SP) particles showed particles with irregular shapes and large particle size distribution at a magnification of 300X. Surface roughness was revealed at magnification of 10 000X where agglomeration of individual particles on the surface of larger particles was also observed.

For HAS-0(SD) and CMS(SD), the micrographs showed spherical micronized particles with indented rough surfaces. At higher DS, CMS2(SD) and CMS3(SD) micrographs showed particles with very a different morphology. Spherical and elliptic cross-section of the CMS2(SD) and CMS3(SD) particles, respectively, appeared as a result of the collapsed

atomized droplets. The HAS-0(Ly) and CMS1(Ly) particles had morphologies similar to those obtained by SP. Lyophilisation of CMS solution yielded to a particle morphology that differed to that of particles obtained from the lyophilisation of suspensions. Indeed, CMS2(Ly) and CMS3(Ly) particles presented prismatic morphology with some apparent microporosity (micrographs at 25 000X) probably resulting from the removal of ice-crystals during the lyophilisation process.

Tableau 5.1 Particle size and size distribution ($n = 2$, $m > 10\,000$ particles), bulk (ρ_B) and tapped (ρ_T) densities, Carr's index (CI) and Hausner ratio (HR) ($n = 3$) of carboxymethyl high amylose starch (CMS) obtained by solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly) at various degrees of substitution (DS) ($n = 3$)

Drying method	Material	Granulometry (μm)					Densities (g/cm^3) and powder flow			
		\bar{D}	D_{10}	D_{50}	D_{90}	Span	ρ_B *	ρ_T *	CI (%)	HR
SP	HAS-0	109.9 \pm 84.4	21.6	80.6	238.6	2.69	0.52	0.72	28	1.38
	CMS1	95.8 \pm 75.8	19.15	69.2	216.1	2.85	0.64	0.87	26	1.36
	CMS2	46.1 \pm 55.3	11.28	25.8	112.6	3.93	0.43	0.62	31	1.44
	CMS3	24.8 \pm 20.8	9.61	18.9	45.1	1.88	0.24	0.54	56	2.25
SD	HAS-0	13.3 \pm 7.6	4.7	11.5	23.5	1.63	0.42	0.73	42	1.74
	CMS1	4.9 \pm 3.1	2.7	5.46	8.7	1.10	0.34	0.64	47	1.88
	CMS2	5.5 \pm 5.8	2.5	5.0	8.7	1.24	0.14	0.33	58	2.36
	CMS3	12.2 \pm 8.9	2.8	7.7	19.0	2.10	0.15	0.31	52	2.07
Ly	HAS-0	96.7 \pm 52.4	32.12	86.9	171.5	1.60	0.45	0.58	22	1.29
	CMS1	103.4 \pm 71.1	33.7	86.5	203.8	1.97	0.43	0.60	28	1.40
	CMS2	63.1 \pm 58.4	10.9	58.9	147.2	2.31	0.30	0.57	47	1.90
	CMS3	57.9 \pm 56.4	11.3	47.7	142.2	2.74	0.30	0.63	52	2.10

* Standard deviation equal or under 0.02

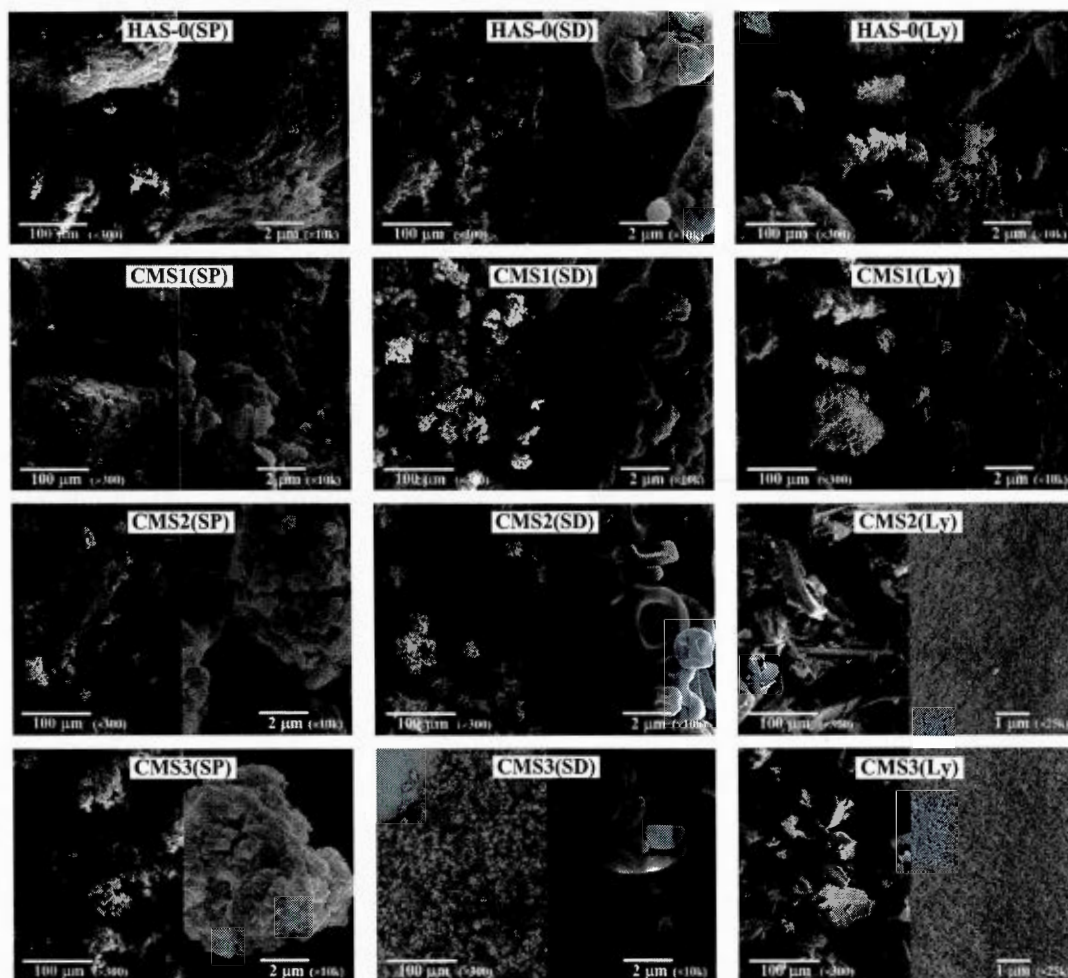


Figure 5.3 Scanning electron micrographs of carboxymethyl high amylose starch (CMS) obtained by solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly), at various degrees of substitution (DS) (SEM at a voltage of 10 or 25 kV, magnification and scale bar value indicated on the pictures).

5.2.5.2.5 Bulk and tapped densities and powder flow properties

The ρ_B and ρ_T as well as resulting flow characteristics are not intrinsic powder physical properties but depend on interparticulate interactions (Fuhrer, 1996). These physical properties were greatly influenced by both the drying method and the DS (tableau 5.1). The SP drying produced the particles with the highest overall particle \overline{D} and thus the powder

with the highest ρ_B and ρ_T . The decrease of particle \bar{D} associated with increasing DS led to a significant decrease of ρ_B from 0.6 to 0.2 g/mL and of ρ_T from 0.9 to 0.5 g/mL for CMS(SP) powder. CMS(SD) micronized particles resulted in powders with the lowest ρ_B and ρ_T . For instance, CMS2(SD) collapsed particles induced a 2-fold diminution of density values. The larger CMS(Ly) particles at low DS induced lower ρ_B and ρ_T values than for CMS(SP) particles, even though they had comparable \bar{D} . The apparent microporosity observed for the CMS2(Ly) and CMS3(Ly) led to lower ρ_B and ρ_T values compared to those of corresponding SP powders.

According to CI and HR values (tableau 5.1), the flowability of CMS(SP) particles ranged in the USP-scale (2012) between *Poor Flow* for CMS1(SP) and CMS2(SP), and *Very Very Poor Flow* for the CMS3(SP). The SD produced powder with *Very Very Poor Flow* since micronized particles are known to be more influenced by triboelectric charge phenomena that increase cohesive forces between the particles and thus decrease powder flow properties. Finally, freeze-drying produced powders with *Poor Flow* properties for CMS1(Ly) and *Very Very Poor Flow* properties for CMS2(Ly) and CMS3(Ly). Flow properties of CMS dried with different methods were poorer or similar to those of the respective HAS-0. Powders with improved flow properties (lower CI and HR values) such as CMS1(SP), CMS1(Ly) and especially CMS2(SP) showed a wide particle size distribution which can favour particle segregation during powder handling or manufacturing process of oral solid dosage forms. These results suggest that the drying step may limit the use of CMS powder as such in dry blend and direct compression applications. Powder flow properties can be improved by optimization of drying process or by standard densification procedures such as dry or wet granulation.

5.2.5.2.6 Thermogravimetric analysis (TGA)

Thermal stability of CMS was reported to be low compared to that of amylose (Desai, Patel et Patel, 1976). TGA and differential thermogravimetric (DTG) measurements of selected representative CMS samples are presented in figure 5.4 and complete thermogravimetric data are presented in tableau 5.2. The reproducibility of the results was considered acceptable

since the differences in normalized weight (%) measured versus temperature were in the range of 0.02 to 1.7%. Each CMS powder sample showed similar TG and DTG curves (figure 5.4) with two stage events occurring at increasing temperature. An initial stage between 25 and 170°C, corresponding to the removal of residual solvents and water, that was followed by CMS decomposition stage (180 to 405°C). Thermal stability of CMS was independent of drying methods but decreased with increasing DS. Temperature range and temperature at maximal degradation rate (T_{max}) (tableau 5.2 and insert figure 5.4 b) decreased at increasing DS. These results suggest that thermal stability of CMS was mainly controlled by the starch chemical backbone (links between the GU), rather than by the drying methods. The lowest temperature of degradation was observed for CMS3(SP) (180°C) which was still higher than typical temperatures involved in standard drying process and pharmaceutical operations.

Tableau 5.2 presents the moisture content (%) determined by TGA during the initial thermal stage. The drying methods used during this study efficiently removed water to values similar to those of native starch and other modified commercial starches (5 to 15%) (Daniel *et al.*, 2007 ; Rowe, Sheskey et Owen, 2006). The SP and SD produced CMS powder with comparable moisture content of approximately 10%. Ly produced CMS powder with the lowest water content at approximately 5%. The influence of DS on CMS powder moisture was negligible. CMS1(SP) had a lower water content than CMS2(SP) and CMS3(SP) since for SP samples, hydrophilicity and V-type structure of the CMS increased with DS as well as the powder susceptibility to hydration. The difference in water content of CMS2(SP) and CMS3(SP) compared to HAS-0(SP) typical value of 10% was less important than the difference between HAS-0(SP) and CMS1(SP). For SD, the water content was consistent with particle characteristics. At higher DS, the water content decreased with the reduction of the particle diameter thus reducing the mass transfer path for CMS(SD) particles. For Ly, moisture content slightly increased with DS and hydrophilicity of CMS due to the presence of more regions of V-type structure within the crystallites of the CMS2(Ly) and CMS3(Ly). These results showed that water content of CMS particles was mainly related to the drying procedure and process parameters and only slightly influenced by the DS which modified the

hydrophilicity and crystalline structure of the CMS. The relatively high water content of CMS(SP) and CMS(SD) particles as well as their hydrophilicity show that special attention should be paid to long term stability of dosage forms using CMS particularly in presence of moisture sensitive active pharmaceutical ingredients. Addition of a desiccant will probably be required for storage.

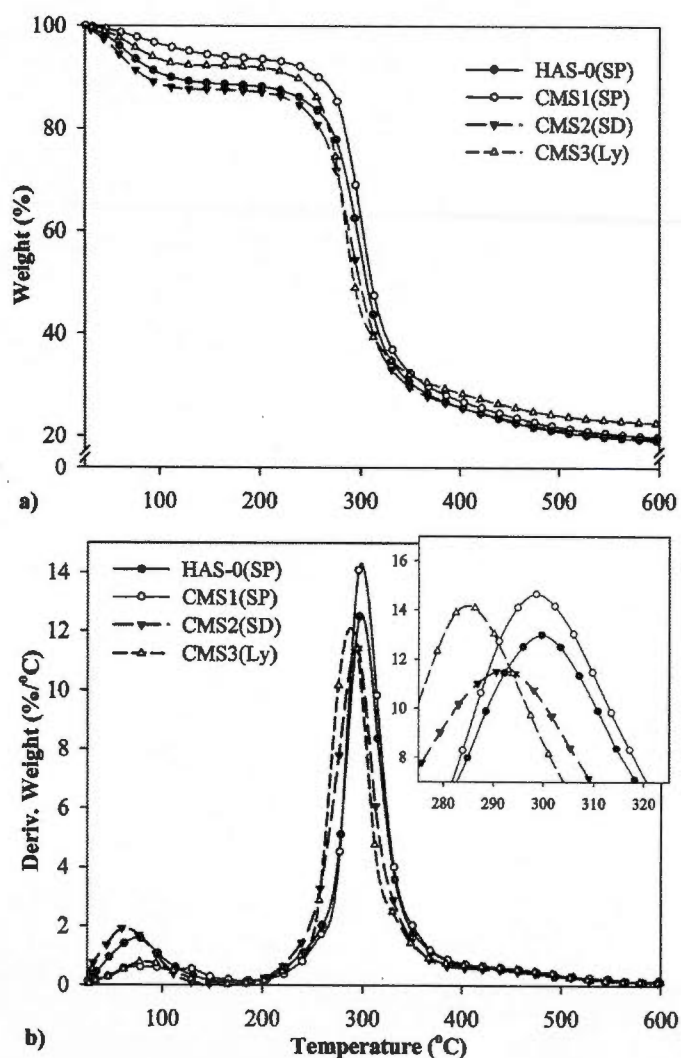


Figure 5.4 TG (a) and DTG (b) thermograms of representative carboxymethyl high amylose starch (CMS) samples obtained by solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly) at various degrees of substitution (DS): HAS-0(SP), CMS1(SP), CMS2(SD) and CMS3(Ly) ($n = 2$).

Tableau 5.2 Thermogravimetric data of carboxymethyl high amylose starch (CMS) obtained by solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly) at various degrees of substitution (DS) (n=2)

Drying method	Material	Stage 1			Stage 2			% Residue at 600 °C ***
		Temperature range (°C)*	T _{max} (°C)*	% Water content**	Temperature range (°C)*	T _{max} (°C)*	% Weight loss***	
SP	HAS-0	37-145	72	10.5	208-398	300	69.1	21.6
	CMS1	35-162	91	6.0	194-395	298	71.9	21.0
	CMS2	34-155	73	11.4	182-388	293	68.5	22.8
	CMS3	32-132	65	9.5	180-367	285	68.1	23.8
SD	HAS-0	31-164	74	11.4	197-408	301	71.9	20.1
	CMS1	31-156	75	14.7	195-398	299	72.9	21.0
	CMS2	30-141	65	12.1	188-384	292	69.5	22.3
	CMS3	31-131	77	7.5	186-365	286	69.2	24.4
Ly	HAS-0	32-169	93	4.3	203-403	300	72.1	21.5
	CMS1	31-158	92	4.5	195-398	299	73.2	20.3
	CMS2	32-147	86	4.8	192-386	293	66.2	25.7
	CMS3	33-141	87	5.4	187-385	285	64.3	27.1

* Standard deviation equal or under 4°C.

** Standard deviation equal or under 1.5 %.

*** Normalized with dry mass, standard deviation equal or under 1.5 %.

5.2.5.3 Characterization of CMS tablet

As presented above, both DS and drying method had a significant impact on the particle size \bar{D} , size distribution, particle morphology and surface properties of CMS powders. It is known that these properties, as well as powder structural organisation, water content and solubility are among the factors that can influence the compression process and the drug release kinetics from oral solid dosage forms (Jamzad, Tutunji et Fassihi, 2005).

5.2.5.3.1 Physical characterization of tablets

For starch derivatives, compression properties are mainly function of the plastic deformation of the particles under the action of the forces that lead to formation of bonds between the surface of the deformed particles by Van der Waals forces, solid bridges and mechanical interlocking (Adolfsson, Olsson et Nyström, 1997). In general, a decrease in \bar{D} as well as increasing of particle roughness and water content, until an optimal value, will result in higher bonding between the deformed particles and, subsequently, higher tablet strength (Korhonen *et al.*, 2002). Particle compressibility was assessed by tablet thickness, crushing strength and friability (figure 5.5). For CMS(SP), the decrease of particles \bar{D} with increasing DS resulted in a significant increase of crushing strength up to 345 N and a decrease of thickness and friability. Compared to HAS-0(SP), CMS1(SP) had a lower crushing strength probably related to a lower water content which can reduce the plastic deformation of the particles and thus lead to increased particle fragmentation similarly to that of acetaminophen particles as shown by Garekani *et al.* (2001).

CMS1(SD) tablets had higher crushing strength probably due to smaller particles \bar{D} and higher water content compared to CMS2(SD) and CMS3(SD) tablets (figure 5.5b). The rough surface of CMS1(SD) particles compared to the smooth surface of CMS2(SD) particles resulted in a significantly higher crushing strength for particles with similar \bar{D} , water content and tablet thickness. Further increase of the DS to CMS3(SD) induced higher crushing strength.

For the same DS, CMS(Ly) tablets had the lowest crushing strength and higher thickness compared to other drying methods, except for CMS1(Ly). The poor compression properties of the CMS(Ly) appeared related to the lower water content. However, at increased DS, the crushing strength was considerably higher while thickness and friability remained comparable. These results, added to the increase in crushing strength from CMS2(SD) to CMS3(SD) tablets, suggest that the stabilisation via carboxylic groups and its influence in the amorphous region of the CMS in function of DS may play a role on the compaction properties of the material.

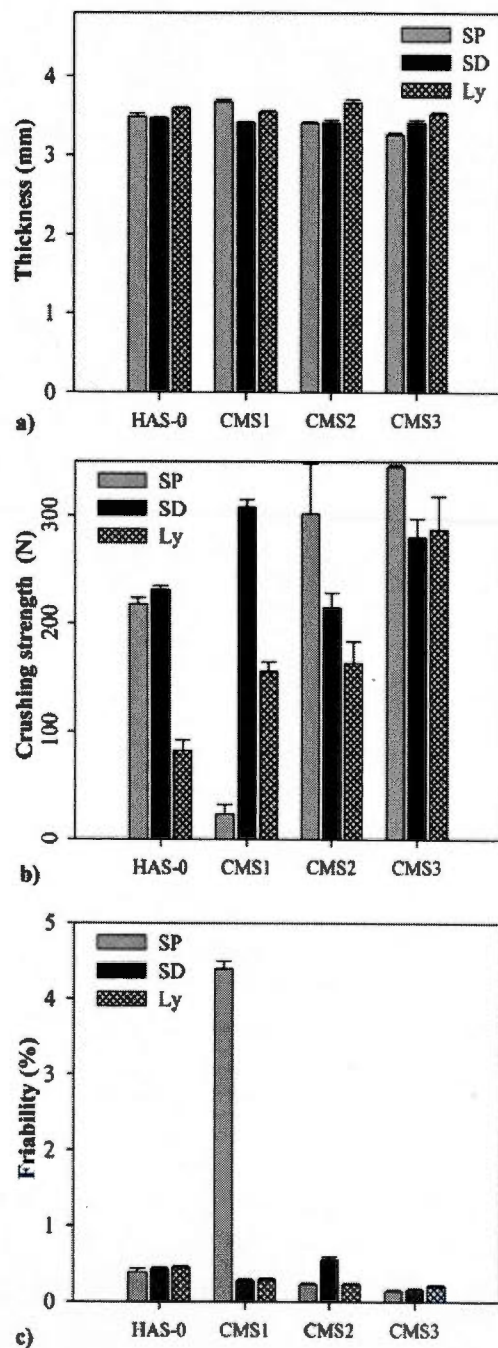


Figure 5.5 Physical and mechanical characteristic of direct compression tablets from carboxymethyl high amylose starch (CMS) obtained by solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly) at various degrees of substitution (DS) loaded with acetaminophen (20 % w/w): (a) thickness ($n = 6$), (b) crushing strength ($n = 6$) and (c) friability ($n = 2$, $m = 10$).

No significant differences in compression properties were found (figure 5.5) for B-type (CMS1) versus V-type structure (CMS2 and CMS3). All CMS tablets showed low friability (less than 0.5%), except for CMS1(SP) where insufficient hardness resulted in high friability. Higher DS generated particles with improved compression when compared to the corresponding HAS-0 dried with the same methods. These results suggest that these CMS derivatives may be convenient excipient for tablet dosage forms as per their adequate compressibility.

5.2.5.3.2 *In vitro* drug release properties

Figure 5.6 presents dissolution profiles obtained for CMS and control HAS-0 tablets in (a) SGF (pH 1.2) only and (b) SGF for the first 2 h and then in SIF (pH 6.8) until complete release of the model drug acetaminophen. Table inserts present drug release times ($T_{100\%}$), kinetic constants (k) and release exponents (n) of selected representative tablet samples. A fast dissolution in SGF occurred for all HAS-0 and CMS1 tablets regardless of the drying method and despite certain differences in their physical properties. The immediate drug release from CMS1 tablets with almost instantaneous disintegration of the tablet in acidic dissolution medium seems due to rapid water penetration between the slightly soluble CMS1 particles, annihilating the cohesive forces between the particles that have been created during the compression of the tablets. Therefore, CMS1 acted as a disintegrant such as several other starch forms in oral solid dosages. This observation is consistent with similar crystalline patterns observed for CMS1 and HAS-0 (figure 5.1).

Figure 5.6 also showed that a DS of 0.14 (CMS2) or higher can control drug release over 1h for Ly, 17h for SD and 18 h for SP. This minimal DS (0.14) of CMS also corresponds to the crystalline structure modification from predominant B-type to V-type (figure 5.1). Hydration of CMS2 and CMS3 powders induced the formation of a gel-layer by the entanglement of the swollen single helix chains (V-type structure) through attractive intermolecular interactions and water bridging. For CMS, these intermolecular interactions are pH dependent and also related to hydrogen bonding between hydroxyl groups, hydroxyl groups and carboxylic or carboxylate groups and between dimerized carboxylic groups. In CMS2(SP) gel-layer, polymer chains were strongly entangled, limiting water penetration within the tablet and thus

leading to the lowest values of “k” and “n”. In this case, drug release was more influenced by a slow diffusion of the drug through the gel-layer ($n \approx 0.60$). This value is closer to the 0.45 limit for diffusion-controlled, than to the 0.89 limit ascribed for swelling-controlled drug release (Ritger et Peppas, 1987). For CMS2 tablets, neither cracking nor capping were observed during dissolution irrespective of drying methods, suggesting that a more uniform tablet hydration at increased DS ensures a better preservation of the gel-layer integrity. At further increasing DS, higher hydrophilicity and a greater amorphous ratio were most probably responsible for a slight $T_{100\%}$ decrease from 18 to 14 h for CMS2(SP) and CMS3 (SP) tablets, respectively. Higher water content in the gel-layer reduced the compactness of the gel network leading to an increase of “k” value to $0.21 \text{ h}^{-0.7}$ and “n” value to 0.70. These results indicate an increase of both diffusion and swelling contributions to sustained drug release mechanism at higher DS (0.25).

The drug release from CMS tablets with a DS between 0.14 and 0.25 presented almost pH independent release rates since no statistically significant discontinuity of the drug release rate was observed after changing the dissolution medium after 2 h from SGF to SIF (figure 5.6b). Thus, the CMS hydrogel formed and the release profile support the hypothesis of hydrogen bonding between hydroxyl groups and between hydroxyl groups and carboxylic groups (at low pH) or carboxylate groups (at neutral pH). Thus, CMS at moderate-high DS (0.14 - 0.25) appears more appropriate as excipient for sustained release than for delayed, pH dependent release formulation.

Similar drug release profiles between CMS2(SP) and (SD) as well as CMS3(SP) and (SD) tablets (figure 5.6) confirmed that for these two CMS, the drying method had no significant influence on the crystalline structure, even if they generated differences in physical properties. Compared to corresponding CMS(SP), these different powder properties markedly influenced the drug release kinetics for CMS(Ly) and CMS(SD) tablets. For CMS(SD) tablets, the slightly lower $T_{100\%}$ by 1 h for CMS2 and 3 h for CMS3 was probably due to the lower crushing strength compared to CMS(SP) which allowed faster water penetration in the tablets.

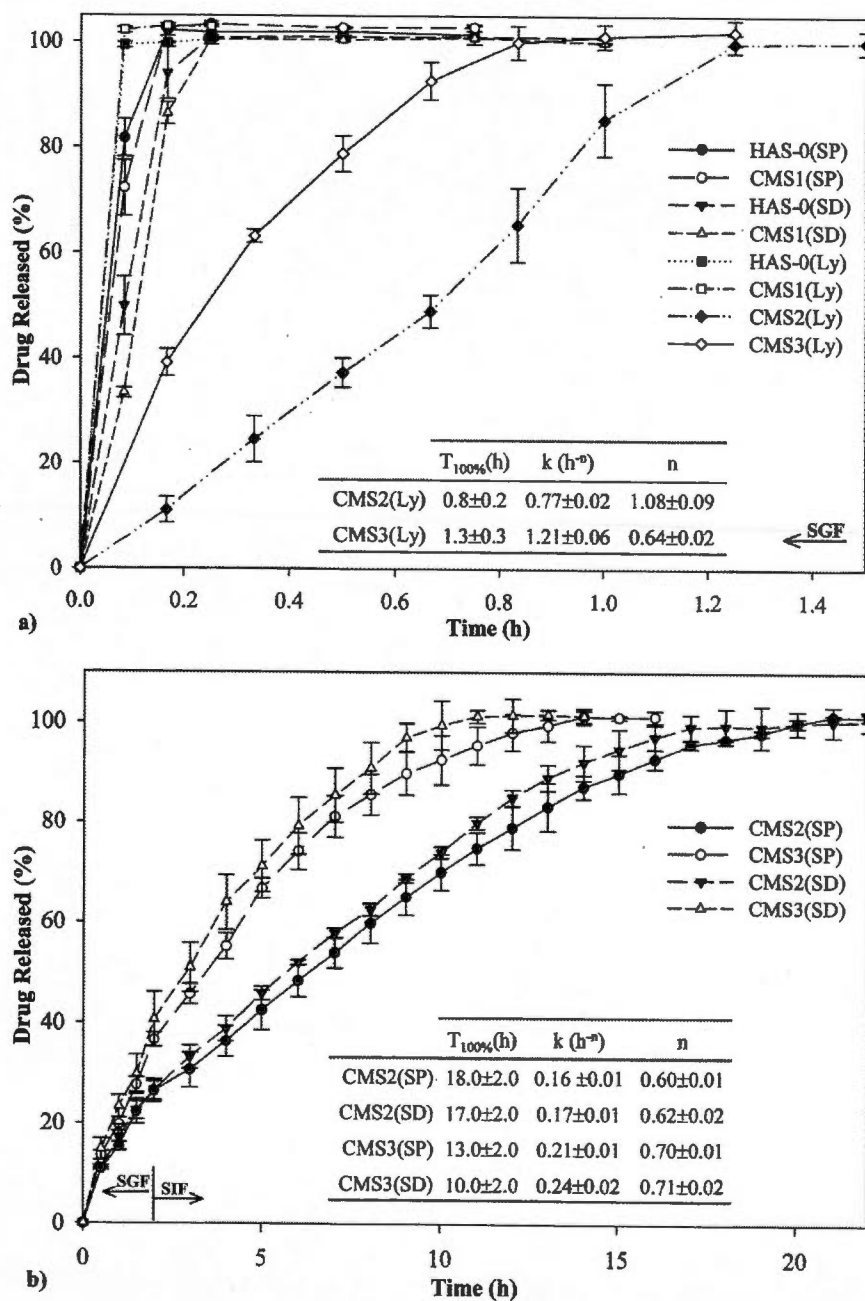


Figure 5.6 Dissolution profiles of acetaminophen (20 % w/w) from carboxymethyl high amylose starch (CMS) tablets obtained by solvent precipitation (SP), spray drying (SD) or lyophilisation (Ly) at various degrees of substitution (DS): a) in SGF for 1.5 h for HAS-0 (SP, SD, Ly), CMS1 (SP, SD, Ly), CMS2(Ly) and CMS3(Ly) and b) in SGF for 2 h followed by SIF for CMS2(SP, SD) and CMS3(SP, SD) ($n = 3$).

The microporosity of CMS2(Ly) and CMS3(Ly) particles significantly increased water penetration rate into the tablet matrix resulting in a dramatic decrease of $T_{100\%}$ to 0.8 and 1.25 h for CMS2(Ly) and CMS3(Ly) tablets, respectively. Faster water penetration inside the tablet matrix did not allow formation of hydrogel by the polymer chain entanglement. This phenomenon induced a fast erosion of the tablet matrix as showed by the high k ($0.77 \text{ h}^{-1.08}$) and n (1.08) values for CMS2(Ly) (figure 5.6a). Lower $T_{100\%}$ of CMS2(Ly) tablets can be ascribed to smaller number and size of micropores compared to CMS3(Ly) particles (figure 5.3). However, dissolution profiles of CMS3(Ly) tablets confirmed that the amount of entanglement between the polymer chains increased with DS (regardless to the drying method) since the drug release from CMS3(Ly) tablets was still driven by a contribution from diffusion mechanism ($n \approx 0.64$).

5.2.6 Conclusion

The influence of drying methods (solvent precipitation, spray-drying and lyophilisation) and DS up to 0.25 was investigated on the solid-state and drug release properties of CMS. A DS of at least 0.14 was necessary to induce a modification of the polymorphism from B-type to V-type patterns whereas the drying method had no influence on the crystalline structure of the CMS particles. Relative solubility and hydrophilicity of CMS were also function of the DS. A minimal DS of 0.14 allowed CMS to become freely soluble in cold water. Particle size, size distribution, particle morphology and surface characteristics as well as the bulk/tapped densities and powder flow characteristics were function of both drying process and DS. Thermogravimetric analysis showed that thermal stability of CMS was predominantly driven by the starch chemical backbone, partially dependent of the DS, and independent of the drying method. The water content of CMS powder was mainly dependant on the drying processing and only slightly influenced by DS. These structural and physico-chemical differences influenced the properties of tablets made from CMS of different DS and dried by various procedures. Most of the CMS evaluated presented adequate compression properties. Finally, CMS with a DS of 0.14 or 0.25 obtained either by solvent precipitation or spray-drying process appeared suitable for sustained release applications over 10 to 17 h almost irrespective to pH.

5.2.7 Acknowledgements

Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Canada Foundation for Innovation (CFI) support to M. A. Mateescu is gratefully acknowledged. Ph. D. graduate studentship from NSERC and Corealis Pharma Inc. (Montreal, Canada) awarded to M. Lemieux is also gratefully acknowledged. Special thanks are due to Dr. Roch Thibert for insightful comments on the manuscript and to F. Byette, R. Mineau and M. Preda for providing technical support for this work.

CHAPITRE VI

CARBOXYMÉTHYL AMIDON RICHE EN AMYLOSE COMME EXCIPIENT POUR LA LIBÉRATION CONTRÔLÉE DE MÉDICAMENTS. ÉTUDES DES MÉCANISMES DE LIBÉRATION ET DE L'INFLUENCE DU DEGRÉ DE SUBSTITUTION

6.1 Présentation de l'article 2

Bien que le manuscrit présenté dans ce chapitre a été le premier publié au cours de la réalisation de cette thèse, la motivation de ce manuscrit fait suite aux travaux portant sur l'influence des méthodes de séchage et de faibles degrés de substitution sur la structure et les propriétés de libération des CMA (chapitre V). En effet, ces travaux ont montré que les CMA ayant des degrés de substitution entre 0,14 et 0,25 (formulés sous forme de comprimés monolithiques avec un principe actif modèle non chargé en milieu acide ou neutre) modulaient très faiblement le taux de libération du principe actif en fonction du pH du milieu de dissolution (acide vs neutre). Ces résultats signifiaient que les propriétés de ces CMA étaient probablement plus appropriées pour le développement de formes à libération prolongée. Toutefois, ces résultats ne s'inscrivaient pas à l'intérieur du concept soutenant la carboxyméthylation des amidons, pour produire un type d'excipients pour des formulations orales solides ayant la capacité de moduler les taux de libération des PA en fonction du pH du milieu environnant.

Pour répondre à cette problématique, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation du DS à des valeurs supérieures à 0,25 permettrait d'obtenir des CMA possédant des propriétés de libération retardée ou ciblée lorsqu'administrés oralement sous forme de comprimés monolithiques. Spécifiquement, nous voulions que le taux de libération des principes actifs en milieu acide soit significativement réduit par rapport à celui en milieu neutre.

Afin de vérifier cette hypothèse, la première étape fut de modifier la méthode de synthèse des CMA. Au moyen de la littérature scientifique traitant des méthodes de synthèse des CMA (section 3.3.2), j'ai déterminé que la méthode la plus appropriée dans un contexte industriel était une méthode de synthèse diphasique en milieu organique. Par la suite, j'ai optimisé les paramètres de réaction du protocole de synthèse des CMA spécifiquement pour l'amidon riche en amylose (Hylon VII) utilisé dans le cadre de cette étude selon des critères de maximisation du DS et du rendement de la réaction et de minimisation de l'agglomération du polymère au cours de la réaction (section 4.5.1). J'ai ensuite caractérisé les propriétés physiques des CMA ayant différents DS sous forme de poudre obtenus au moyen de ce nouveau protocole de synthèse et subséquemment convertis sous forme acide et j'ai caractérisé les propriétés physiques et de libération de médicaments de ces CMA sous forme de comprimés monolithiques. Les résultats obtenus par ces caractérisations furent communiqués au moyen du manuscrit présenté ci-dessous et au moyen de diverses communications par affiche et par présentation orale.

Il est à noter que la réalisation de ce manuscrit aurait été impossible sans la participation active du Pr Mircea A. Mateescu et du Dr Patrick Gosselin qui ont suivi l'évolution des expérimentations ainsi que des résultats obtenus, fourni une assistance sur l'élaboration du manuscrit et révisé le manuscrit.

**6.2 Carboxymethyl high amylose starch as excipient for controlled drug release.
Mechanistic study and the influence of degree of substitution.**

Marc Lemieux¹, Patrick Gosselin², Mircea Alexandru Mateescu^{1,*}

¹ Department of Chemistry and Centre pharmaqam, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec), Canada, H3C 3P8

² Corealis Pharma Inc., 141 President-Kennedy, suite SB-6520, Montréal (Québec), Canada, H2X 3Y7

* Corresponding author: Mircea Alexandru Mateescu

Department of Chemistry,
Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec), Canada, H3C 3P8
Phone: +1 514 987 4319,
Fax: +1 514 987 4054.
E-mail address: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Article publié dans « International Journal of Pharmaceutics », 2009, vol. 382, p. 172-182.

6.2.1 Résumé

Des carboxyméthyl amidons riches en amylose en forme sodique, CMARA(Na), ayant des valeurs de degrés de substitution (DS) jusqu'à 1,74 ont été produits au moyen d'une réaction diphasique dans un milieu organique (rendement maximal de 72 %) afin d'étudier l'influence du DS sur leurs propriétés physiques et de libération de médicaments. Les CMARA(Na) ont été convertis en leur forme acide, CMARA(H), par traitement au moyen d'un acide. Le DS et la conversion en forme acide avaient un impact significatif sur les propriétés physiques des granules de CMARA et conséquemment sur les propriétés des comprimés. Les tests de dissolution réalisés dans des fluides gastriques simulés (FGS, pH 1,2) et dans des fluides intestinaux simulés (FIS, pH 6,8), avec comme médicament modèle l'acétaminophène (teneur de 20%), ont montré que les CMARA étaient des matrices hydrophiles sensibles au pH, où seulement les CMARA(Na) semblent appropriés comme matrice pour la libération contrôlée. Les CMARA(Na) ayant un DS entre 0,1 et 0,2 peuvent être utilisés préférentiellement comme matrice pour la libération prolongée puisque dans les deux milieux de dissolution, la libération du médicament était dominée par diffusion sur une période allant jusqu'à 12 h. Les CMARA(Na) ayant un DS élevé, entre 0,9 et 1,2, peuvent être utilisés comme excipient pour la libération retardée puisque la libération du médicament était dominée dans le FGS par diffusion sur une période allant jusqu'à 20 h et dans le FIS par une érosion rapide diminuant à moins de 3 h la libération complète du médicament.

Mots-clés : Carboxyméthyl amidons riches en amylose, synthèse non-aqueuse, degré de substitution, comprimé monolithique, libération prolongée, libération retardée

6.2.2 Abstract

Sodium carboxymethyl high amylose starch, CMHAS(Na), with a DS up to 1.74 were synthesized in non-aqueous medium (with yields as high as 72%) in order to investigate the influence of the degree of substitution (DS) on physical and drug release properties. The CMHAS(Na) was converted to protonated form, CMHAS(H), by acid treatment. The DS and conversion of CMHAS(Na) to CMHAS(H) had a major impact on the physical properties of CMHAS particles and resulting tablet properties. Dissolution tests performed in simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2) and in simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8), with acetaminophen as drug model (20% loading) showed CMHAS as a pH sensitive hydrophilic matrix whereas CMHAS(Na) seems suitable as controlled release matrix. CMHAS(Na) with DS between 0.1 and 0.2 can be preferably used as sustained release excipient since in both dissolution media, the drug release was driven by diffusion over a period up to 12 h. CMHAS(Na) with high DS, between 0.9 to 1.2, can be used as delayed release excipient since drug release in SGF was driven by diffusion over a period up to 20 h and in SIF by fast erosion lowering to less than 3 h the complete release of the drug.

Keywords : Carboxymethyl high amylose starch, non-aqueous synthesis, degree of substitution, monolithic tablet, sustained release, delayed delivery.

6.2.3 Introduction

Starches are widely used as fillers, binders and disintegrants in the pharmaceutical and biopharmaceutical fields as they are cost-effective, renewable materials available in large quantities, non-toxic, biocompatible and biodegradable particularly when administered orally (Demirgoz *et al.*, 2000 ; Désévaux *et al.*, 2002 ; Dumoulin, Cartilier et Mateescu, 1999 ; Pifferi, Santoro et Pedrani, 1999). Native starches are not suitable for controlled drug delivery systems due to poor flow and compressibility and, most notably, fast release properties resulting from substantial swelling in aqueous media along with rapid enzymatic degradation by α -amylase in physiological fluids (Dumoulin, Cartilier et Mateescu, 1999 ; Kost et Shefer, 1990). Starch is composed of two distinct polymers: amylose and amylopectin. Amylose is an unramified polymer with glucopyranose units (GU) (≈ 200 to 2000) linked through $\alpha(1-4)$ glucosidic bonds. Amylopectin is a highly branched polymer where linear branches ($\approx 20-30$ GU linked through $\alpha(1-4)$ glucosidic bonds) are periodically linked through $\alpha(1-6)$ glucosidic bonds (total GU up to 3×10^6) (Wurzburg, 1986).

To overcome these limitations and extend the applications of starch as excipient for sustained drug delivery, the properties of starch can be tailored by physical modification (*e.g.* retrogradation) (Te Wierik *et al.*, 1997), chemical modification (*e.g.* cross-linking, esterification) (Korhonen *et al.*, 2000 ; Lenaerts, Dumoulin et Mateescu, 1991) or enzymatic hydrolysis (*e.g.* dextrins) (Stella et Rajewski, 1997). Among these starch derivatives, carboxymethyl high amylose starch (CMHAS, more than 70% amylose), was recently introduced (Mulhbacher, Mateescu et Calinescu, 2008) as excipient for oral monolithic tablets able to control the release of active molecules (Ispas-Szabo *et al.*, 2007 ; Nabais *et al.*, 2007) and of bioactive agents (Calinescu *et al.*, 2005 ; Calinescu *et al.*, 2007). As excipient, CMHAS was used as sodium salt, CMHAS(Na), but the acid form (protonated, CMHAS(H)) is also available. It is generally synthesized by etherification of the hydroxyl groups (-OH) of the GU with sodium carboxymethyl groups (CM, CH_2COONa) using monochloroacetic acid (MCA) or its sodium salt (NaMCA) under basic conditions according to the Williamson ether synthesis (Heinze et Koschella, 2005). The aim of starch carboxymethylation in the pharmaceutical industry is to convert native starches to an ionic hydrophilic excipient able to

modulate the drug release according to the physiological pH values. In acidic dissolution medium below the pKa value of CMHAS (about 4.2) hydrogen association, by dimerization of protonated CM groups (-COOH) are expected to enhance the strength of the gel-layer, reducing thus the drug release rate. Otherwise, in a dissolution medium above the pKa of CMHAS, the deprotonation will reduce the gel-layer strength, by enhancing the matrix hydration and the repulsive forces between dissociated CM groups (-COO⁻), increasing the drug release rate. The properties of CMHAS(Na), including the control of drug release would probably be in functions of the degree of substitution (DS), defined as the average number of CM groups per GU and lies between 0 and 3. Previously, CMHAS(Na) with DS between 0.15 and 0.3 were mainly used since it was shown that these DS were the most suitable for controlled drug delivery (Calinescu *et al.*, 2005 ; Lemieux, Gosselin et Mateescu, 2007). However, drug release from CMHAS(Na) matrix with DS under 0.3 appears to have a low pH sensitivity. The CMHAS(Na) was produced in aqueous reaction medium leading to DS lower than 0.3 (Volkert *et al.*, 2004) with low reaction yields (below 30%). Several studies were carried out to optimize reaction conditions in order to increase DS and reaction efficiency (Heinze *et al.*, 2004 ; Lazik *et al.*, 2002 ; Sangseethong, Ketsilp et Sriroth, 2005 ; Stojanovic, Jeremic et Jovanovic, 2000 ; Tijssen *et al.*, 2001 ; Tijssen *et al.*, 1999 ; Volkert *et al.*, 2004). Essentially, CMHAS(Na) with higher DS was obtained by starch carboxymethylation in organic solvent medium (*e.g.* methanol, ethanol, isopropyl alcohol) containing only a small fraction of water. The use of organic medium has the advantage of keeping starch in its granular form all along the reaction (Tijssen *et al.*, 1999) and hence simplifying the production process by eliminating additional precipitation steps. In the context of development of a new hydrophilic polymer as excipients for controlled drug delivery, the aim of this study was to investigate the influence of DS on the physical characteristics and drug release properties of CMHAS produced in non-aqueous medium. It was expected that increasing DS will modify the polymer chain interactions according to the environmental pH. Furthermore, an increasing enzymatic resistance of CMHAS to amylolysis by α -amylase was previously reported (Kwon *et al.*, 1997). In order to better understand the polymer chains-chains or chain-medium interactions and their role on the properties of CMHAS, the investigation was also performed with CMHAS(H) in comparison

with CMHAS(Na). This study seems to be, at our knowledge, the first contribution to investigate the drug release from CMHAS at high DS (above 0.66). This report was further motivated by the fact that queries still remain about the mechanism of drug release from CMHAS(Na) tablets with low DS. In order to answer these questions, monolithic tablets were deliberately maintained in SGF longer than the physiological gastric residence time, in order to better understand the structural characteristics ensuring the shape maintaining and release controlling properties.

6.2.4 Materials and Methods

6.2.4.1 Materials

High amylose corn starch (HAS) (Hylon VII) was supplied by National Starch (USA). Pancreatin eight times strength with α -amylase, lipase and proteolytic activities (A&C American Chemicals Ltd, CAN). Acetaminophen (Sigma-Aldrich, USA), sodium monochloroacetate (NaMCA) (Fluka, USA) and other chemicals were reagent grade and used without further purification.

6.2.4.2 Synthesis of CMHAS

An amount of 100 g (dry mass) of granular HAS ($15 \pm 5 \mu\text{m}$) was suspended in 1 kg of 2-propanol/water 90:10 w/w at 40°C in a 2 L jacketed reaction glass vessel (Chemglass, USA) equipped with a servocontrolled speed (N, 400 rpm) and power (P, 18.5 W) monitoring mixer head (Cole-Palmer Instrument model 5000-40, USA) fitted with a Rushton turbine and an anchor agitator to ensure constant and vigorous stirring all along the synthesis. Subsequently, 50 g of NaOH pellets (NaOH/GU molar ratio 2:1) was added to the reaction mixture and stirred for 30 min to induce swelling of the starch granules. The carboxymethylation was started by adding NaMCA and stopped after 4 hours by neutralizing the reaction mixture with glacial acetic acid and cooling at room temperature. For this study, CMHAS(Na) with 6 different DS was synthesized by varying the NaMCA/GU molar ratio (0.15:1, 0.25:1, 0.6:1, 1:1, 1.5:1 and 2:1) in the reaction mixture. CMHAS(Na) was recovered by filtration (Büchner with grade 54 cellulose filter paper, Whatman, USA) and purified by successive resuspension/filtration with a methanol/water (80:20 v/v) solution until the filtrate

conductivity was under 25 $\mu\text{S}/\text{cm}$ in order to ensure removal of residual salt ions. The purified CMHAS(Na) was then washed with acetone to remove water excess, filtered and dried in oven (Blue M model 200A, USA) for 24 h at 60 °C. The powder was finally screened over a 300 μm sieve prior to use.

The reaction yield (Y) is defined as:

$$Y[\%] = \frac{DS}{DS_t} \times 100 \quad (6.1)$$

for which DS_t is the maximum theoretical degree of substitution, given by:

$$DS_t = \frac{n_{LR}}{n_{GU}} \quad (6.2)$$

where n_{LR} and n_{GU} are respectively the molar amount of NaMCA limiting reactant and glucopyranose units.

In order to further increase DS, CMHAS(Na) was also synthesized by two consecutive reactions steps using a NaMCA/GU molar ratio of 2:1 in each reaction. The synthesis conditions for the second step were identical as previously described but where the ratio of 2-propanol/water was 95:5 w/w. For two steps carboxymethylation reaction, the DS_t is defined as the sum of the individual DS_t of each reaction ($\sum_{i=1}^2 \Delta DS_{t,i}$).

Conversion to the acid form CMHAS(H) was obtained by adding 30 mL of 6M HCl per 10 g of dry sample in a CMHAS(Na)/acetone suspension (0.1 g/mL) under continuous stirring for 120 min (Stojanovic *et al.*, 2005). To remove the excess of acid, the CMHAS(H) was purified, washed and dried using the same protocol as for CMHAS(Na).

Two non-derivatized controls HAS were prepared under the same reaction conditions as for the synthesis of CMHAS except for: (1) HAS was treated only with 2-propanol/water obtaining HAS_{IPA} and (2) treated with 2-propanol/water and NaOH, obtaining HAS_{NaOH} . Acid controls were also obtained by acid treatment with HCl and respectively identified as $HAS_{IPA}(H)$ and $HAS_{NaOH}(H)$.

6.2.4.3 Determination of degree of substitution (DS)

The DS of CMHAS and HAS controls was determined by back titration (Stojanovic *et al.*, 2005). The CMHAS(H) weighed sample was dissolved in 40 mL of standard 0.1M NaOH. The solution was then diluted in 100 mL of distilled water. The excess of NaOH contained in 25 mL of the solution was back-titrated with standard 0.05M HCl using phenolphthalein as indicator. A blank (without HAS) was also titrated. The amount of CM groups is given by:

$$n_{\text{COOH}} = 4(V_b - V)C_{\text{HCl}} \quad (6.3)$$

where V_b is the volume of HCl used for the titration of the blank, V is the volume of titration of the sample, C_{HCl} is the concentration of the HCl and 4 is the ratio of the total solution volume over the volume sampled for titration. The DS was calculated from the following equation:

$$\text{DS} = \frac{162 \times n_{\text{COOH}}}{m_{\text{dry}} - 58 \times n_{\text{COOH}}} \quad (6.4)$$

Where 162 g/mol is the molecular weight of a GU, 58 g/mol is the increase in molecular weight accounted for each CM group substitution and m_{dry} is the mass of the dry sample.

6.2.4.4 CMHAS particles and powder characterization

6.2.4.4.1 Particle size and size distribution

The granulometry of the CMHAS particles was determined using a transmitted light microscopy (Leica model DM2500M, Germany) interfaced with a color camera (Clemex model L 2.0C CL-13-211, Canada) and an image analysis software (Clemex Vision PE, Canada). Powder samples were randomly spread on a glass slide to obtain a representative sample. 10 000 particles were observed under a 200X magnification and analysed with a developed algorithm. This algorithm incorporated image processing, gray thresholding and geometric constraint to first differentiate the particles from the background and then to eliminate overlapping particles and particles located at the boundary of the frame. Particles

were then characterized by their mean particle size (\bar{D}) and their cumulative particle size distribution (D_{10} , D_{50} and D_{90}) where the size of one particle represents the average value of 64 ferets (distance between two parallel tangents on each side of the particle).

6.2.4.4.2 Particle morphology

Morphology of the CMHAS particles was examined with a Hitachi S-4300SE/N with variable pressure scanning electron microscope (SEM) (Hitachi High Technologies America, USA), at 15.0 kV and under a magnification of 1000X. Samples were prepared on metallic studs using double-sided conductive tape.

6.2.4.4.3 Bulk and tapped densities

The bulk (ρ_b) and the tapped (ρ_t) densities of the powder were determined according to USP method <616> (2008). For each sample, the Carr index (CI, also compressibility index) (Carr, 1965) and the Hausner ratio (HR) (Hausner, 1967) were respectively calculated from eq. (6.5) and (6.6) interpreted as per USP method <1174> (2008):

$$CI = \frac{(\rho_t - \rho_b)}{\rho_t} \times 100 \quad (6.5)$$

$$HR = \frac{\rho_t}{\rho_b} \quad (6.6)$$

6.2.4.4.4 Water content

The water content of the powder was measured by Karl-Fisher titration (795 KFT Titrino, Metrohm, USA) according to USP <921>, method 1c (2008).

6.2.4.4.5 Relative solubility

The relative solubility of the CMHAS derivatives and the HAS controls was determined following Chen and Jane (1994a) and Volkert *et al.* (2004) with slight modifications. The

method consisted of precisely weighing a dry CMHAS sample (1.0 g) and dissolving it in 10 mL of neutral nanopure water or in acidic medium (0.1M HCl, pH 1.0) at 25°C. The solution was vortexed for 1 min and stored at room temperature for 2 h. The solution was then centrifuged for 15 min at 4000 rpm (IEC model HH-II centrifuge, USA), and 5 mL of the supernatant liquid was evaporated in oven (Blue M model OV-12A, USA) at 105 °C until a constant mass was weighed. The mass of dry residue was used to calculate the relative solubility of the sample.

6.2.4.5 CMHAS tablet characterization

6.2.4.5.1 Tablet preparation

Tablets (500 mg, 12 mm-diameter) of CMHAS derivatives and of HAS controls were formulated with acetaminophen (20% w/w loading), as drug model, by dry blending and direct compression at 20 kN using flat faced toolings on hydraulic press (Carver, model Mini C, USA). Tablets were finally dedusted over a 600 µm screen.

6.2.4.5.2 Physical characterization of tablets

Tablet crushing strength was determined (n=6) with a Vankel tester (model VK200, Varian Inc., USA) according to USP method <1217> tablet breaking force (2008). Tablet friability was determined (n=2) with a Vankel friabilator (Varian Inc., USA) according to USP method <1216> (2008). Finally, thickness of the tablets was measured with a digital calliper.

6.2.4.5.3 *In vitro* drug release properties

The dissolution kinetics of the CMHAS(Na) tablets and controls (n=3) were performed in USP dissolution apparatus II (Distek 5100, USA) at 50 rpm in three different media (900 mL, 37°C): pepsin-free simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2), pancreatin-free simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8) and simulated intestinal fluid containing pancreatin (Pan, pH 6.8) (US Pharmacopeial Convention). The dissolution kinetics of the CMHAS(H) tablets were performed in SGF and SIF only for comparison with the CMAHS(Na). Acetaminophen release profiles were measured by UV spectroscopy at 280 nm (Hewlett-Packard spectrophotometer, USA).

To evaluate the drug release mechanism from the CMHAS tablets, the empirical model of Peppas and Sahlin (1989) (1989) was used:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{(2m)} \quad (6.7)$$

Where M_t/M_∞ is the fraction of drug released in time t , k_1 and k_2 are kinetic constants and m is the purely Fickian release exponent. The two terms on the right side of eq. (6.7) represent, respectively, the Fickian diffusionnal contribution (F) and polymer relaxation/erosion (R) contribution to the release profile. The fraction of released drug was fitted, up to $M_t/M_\infty = 0.6$ (60% release), by nonlinear regression to eq. (6.7) using Sigmaplot v. 11 (Systat software Inc., USA) to determine the values of kinetic constants.

6.2.5 Results and discussion

6.2.5.1 CMHAS synthesis

The described method of HAS carboxymethylation in non-aqueous medium allowed synthesis of CMHAS of DS as high as 1.23 with a satisfactory yield of 72% for one step synthesis. DS and yield (Y) of the CMHAS synthesis obtained according to the molar ratio of NaMCA/GU (mol/mol) or DS_t are presented in figure 6.1. First of all, DS increased with the increase of the DS_t. On the other hand, the Y of reaction decreased with the increase of DS and DS_t probably due to some competitive undesirable side reaction of NaMCA with NaOH that can form sodium glycolate (Heinze *et al.*, 2004 ; Stojanovic, Jeremic et Jovanovic, 2000). Indeed the increase of the ratio of NaMCA/NaOH favoured this side reaction (Kooijman *et al.*, 2003). For the synthesis with a low molar ratio of NaMCA/GU (0.15:1), a lower concentration of NaMCA in the reaction medium can reduce the probability to react with starch granules prior to aqueous NaOH which could explain the lower reaction Y.

The Y of the two-step carboxymethylation showed also notable diminution since the Y ($\Delta DS_{(2-1)} / \Delta DS_{t,(2-1)}$) of the second reaction was only 25%. This could be explained by the increased difficulty of NaMCA to react at re-synthesis with the remaining hydroxyl groups with the increase of the DS due to steric hindrance (Sangseethong, Ketsilp et Sriroth, 2005) or electrostatic repulsion caused by the CM groups (Heinze et Koschella, 2005). Moreover, the diminution of the Y can be explained by the fact that in order to avoid swelling and agglomeration of particles during the non-aqueous synthesis for increase DS (Tijssen *et al.*, 1999 ; Volkert *et al.*, 2004), the water mass fraction was reduced to 0.05. A reduction of water mass fraction in the reaction decreased the content of NaOH and NaMCA dissolved in the aqueous phase, hindering the diffusion of reagent into the CMHAS granules by reducing their swelling.

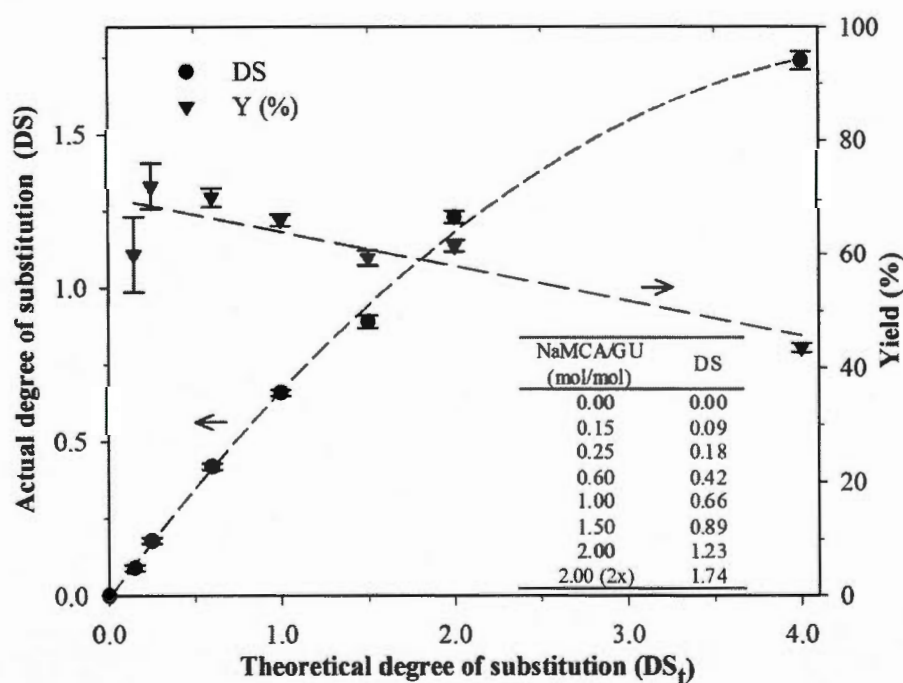


Figure 6.1 Actual degree of substitution (DS) and reaction yield (Y) as function of the theoretical DS of CMHAS synthesized in non-aqueous medium ($n = 3$).

6.2.5.2 CMHAS particles and powder characterization

Physical properties such as particle size and granulometry, morphology, water content, solubility and resulting flow and compression characteristics are among the factors that can influence the kinetics of drug release from solid dosage forms.

6.2.5.2.1 Particle size and size distribution

There is a direct correlation between DS and particle size for both CMHAS(Na) and CMHAS(H), all larger than the controls HAS_{IPA} and HAS_{NaOH} (tableau 6.1). All obtained particles showed a unimodal close to Gaussian particle size distribution. The CMHAS with a DS in the range 0.09 to 0.66, only led to a slight increase of the \bar{D} from 19 to 28 μm but with a wider particle size distribution. The conformation of CMHAS chains is characterized by single-helical. The increase of DS from 0.66 to 0.89 caused a significant increase of the CMHAS \bar{D} up to 48 μm with narrower size distribution relative to median point. The increase of the DS to 1.23 induced a minor increase up to 54 μm of the \bar{D} with a slightly wider particle size distribution. This size value appears to be the highest and a plateau \bar{D} with no significant differences for further increased of the DS to 1.74 was observed.

6.2.5.2.2 Particle morphology

The study of the morphology of the particles (figure 6.2) allowed to explain the mechanism that controlled the increase of the \bar{D} with the increase of the DS. Firstly, the comparison of the HAS_{IPA} particles with the native Hylon VII particles (figure 6.2a, j), showed that the alcohol/heat treatment did not induce any visible modification of the particle morphology. Under these conditions, the swelling of the starch granules by the absorption of water is low (< 10% increase in diameter) and reversible suggesting that HAS_{IPA} and native HAS have equivalent properties. Secondly, figure 6.2b-f shows that HAS_{NaOH} and CMHAS with a DS of 0.09 to 0.66 had similar particles morphology characterized by a deformed sphere shape with an indented surface when compared to the sphere like shapes with a smooth surface of the HAS_{IPA} particles. Deformed surfaces were probably created under alkaline conditions, where the structure of the swollen particles was consequently weakened and easily altered by the

vigorous stirring in the reactor, as well as by removal of the alcohol and dehydration process during the final washing and drying phase. Moreover, figure 6.2 suggests that the reaction occurred not only at the surface but also inside the starch granules. Thirdly, at a DS of 0.89 (figure 6.2g), CMHAS particles are agglomerated but individual particles could still be distinguished at the surface of the agglomerates. To avoid this phenomenon, the water mass fraction should be reduced, but with the consequence of reducing the reaction yield as previously discussed. Finally, with DS of 1.23 and 1.74, (fig. 2h, i), the CMHAS particles were fully agglomerated and showed irregular prismatic morphology.

Tableau 6.1 Particle size and size distribution ($n > 10\,000$ particles), bulk (ρ_B) and tapped (ρ_T) densities, Carr's index (CI) and Hausner ratio (HR) ($n = 3$) of CMHAS(Na) and CMHAS(H) particles

DS (form)		Granulometry (μm)				Densities and powder flow			
		\overline{D}	D_{10}	D_{50}	D_{90}	ρ_B (g/cm ³)*	ρ_T (g/cm ³)*	CI (%)	HR
HAS _{IPA}	-	15.31±6.11	7.91	14.38	24.33	0.46	0.75	39±6	1.63±0.11
	H	14.26±5.43	7.81	13.45	22.33	0.46	0.75	39±6	1.63±0.11
HAS _{NaOH}	-	15.42±6.33	7.99	14.40	24.94	0.37	0.63	41±8	1.70±0.15
	H	13.35±5.40	7.56	12.08	21.57	0.36	0.64	44±8	1.78±0.15
0.09	Na	19.55±6.13	8.56	19.40	27.79	0.45	0.64	30±7	1.42±0.11
	H	18.76±5.09	8.15	18.22	26.91	0.44	0.64	31±7	1.45±0.11
0.18	Na	23.93±8.90	12.86	23.18	36.16	0.47	0.67	30±7	1.43±0.10
	H	21.28±6.25	11.03	22.05	32.20	0.47	0.69	32±7	1.47±0.11
0.42	Na	25.79±6.57	13.37	26.41	34.14	0.51	0.75	32±6	1.47±0.10
	H	22.66±6.31	13.99	23.13	30.86	0.49	0.78	37±6	1.59±0.11
0.66	Na	28.07±11.17	15.20	26.51	43.35	0.66	0.87	24±5	1.32±0.07
	H	28.70±9.94	15.60	28.26	42.55	0.64	0.87	26±5	1.36±0.07
0.89	Na	48.00±20.96	22.07	46.15	78.07	0.72	0.96	25±5	1.33±0.07
	H	47.03±18.13	23.18	44.83	73.20	0.68	0.98	31±5	1.44±0.07
1.23	Na	54.71±25.88	26.32	49.08	94.88	0.71	1.04	32±4	1.46±0.08
	H	53.88±23.87	25.52	49.76	87.22	0.65	0.93	30±5	1.43±0.07
1.74	Na	54.90±24.26	26.78	50.58	89.37	0.73	0.98	26±5	1.34±0.07
	H	52.32±23.25	25.74	48.16	84.77	0.64	0.92	30±5	1.44±0.08

* Standard deviation equal or under 0.02

Tableau 6.1 and figure 6.2 show that no significant difference prevailed between the CMHAS(Na) and CMHAS(H) in terms of \overline{D} , granulometry and particle morphology as a function of DS, suggesting that mainly protonation occurred during the acid treatment conversion.

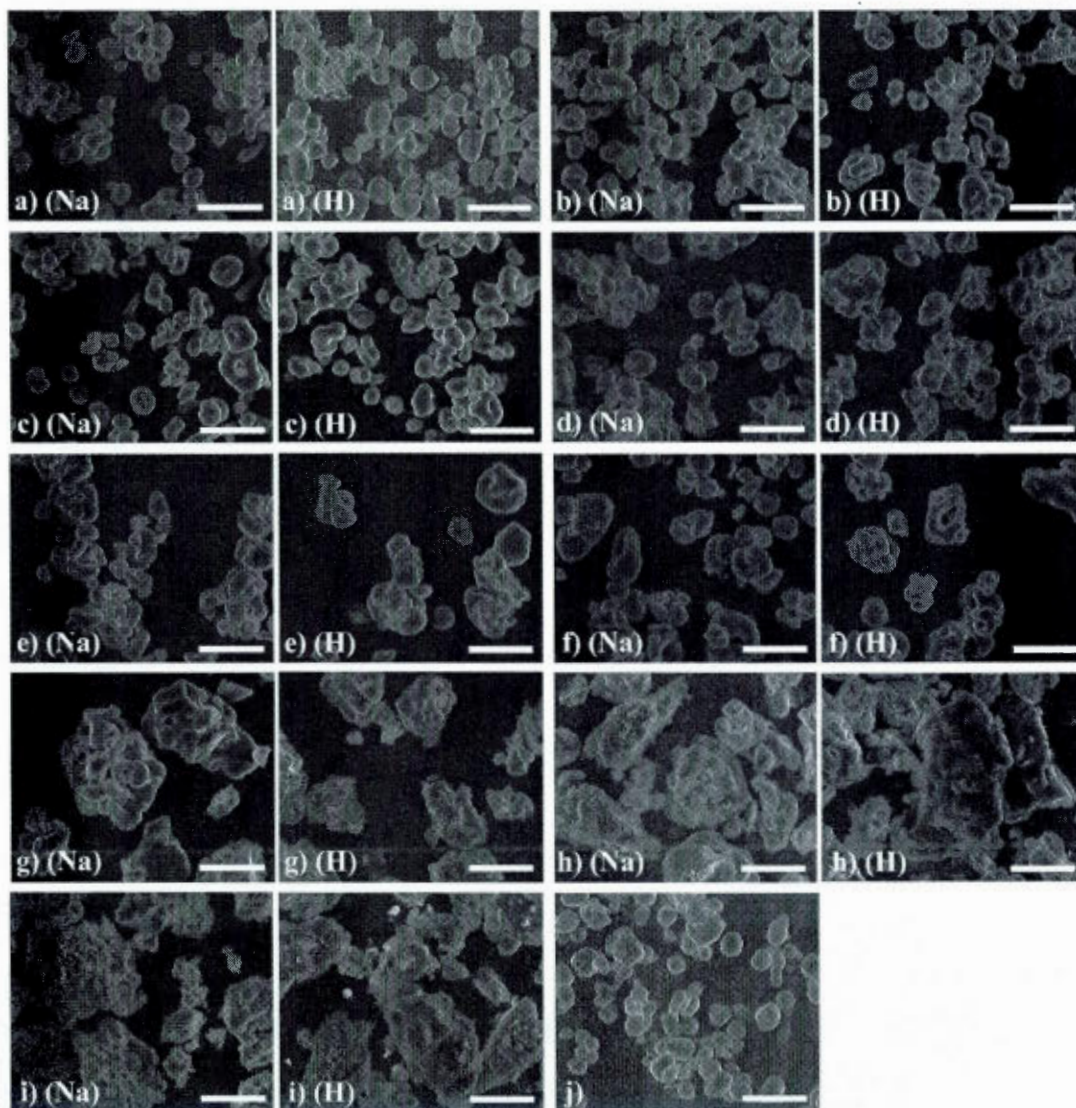


Figure 6.2 Scanning electron micrograph of sodium CMHAS(Na) and protonated CMHAS(H) particles of: a) HAS_{IPA} , b) HAS_{NaOH} , DS of c) 0.09, d) 0.18, e) 0.42, f) 0.66, g) 0.89, h) 1.23, i) 1.74 and j) native HAS. (SEM at a voltage of 15.0 kV and a magnification of 1000X; scale bar 25 μm).

6.2.5.2.3 Bulk and tapped densities

Density values and resulting flowability are presented in tableau 6.1. The increase from 0.5 to 0.7 of the ρ_B and from 0.75 to 1.0 of the ρ_T , with the increase of the DS for both CMHAS(Na) and (H) may be, in a certain extent, ascribed to the increase of the average molecular mass of the CMHAS chains by the addition of the CM groups to the GU. The increase of ρ_B and the ρ_T can also be correlated to the increase of the CMHAS particles \overline{D} . Moreover, the increase of ρ_B and ρ_T were not found to be directly proportional to the DS, to alteration of the particle morphology and to variations in water content into the CMHAS particles. Probably the substitution with highly polar carboxylic groups and water retention increased the flowability via density. According to Carr Index (CI) and Hausner ratio (HR) values of tableau 6.1, flowability of the CMHAS lies between passable and very poor (CI=24-32 %, HR=1.32-1.59), which represents an improvement when compared to controls HAS_{IPA} and the HAS_{NaOH} both classified as very, very poor (CI > 39, HR > 1.60) following US Pharmacopeia XXXI (2008). Nevertheless, all obtained CMHAS presented fairly high and typical density values compared to standard common excipients (Rowe, Sheskey et Owen, 2006).

6.2.5.2.4 Water content

Figure 6.3 shows that moisture of increased from 5.8 % (the base value of HASNaOH) to 15.5% for CMHAS(Na) with the increase of the DS up to 1.23. This trend is probably due to the hydrophilic nature of the CM(Na) groups. The water content at the base value of 5.8% is required by the polymer to maintain its physical integrity. Water content value went down from 15.5% to 12% for the high DS of 1.74, obtained by the two steps reaction. This decrease of moisture was probably due to intensive washing of the powder with organic solvents after carboxymethylation reactions as well as to the reduction of the 2-propanol/water ratio in the reaction medium during the second carboxymethylation step. The higher water content of HASIPA of 13.3% versus HASNaOH controls showed that physical modifications (swelling, deformation) of the particles under alkaline treatment allowed more water to be removed during the washing process. The acid treatment for the conversion of the CMHAS(Na) to CMHAS(H) appears responsible for the decreased moisture for control and CMHAS. A slight

increase of moisture was noticed with increased DS up to 1.23 followed by a decrease for DS of 1.74, more important than for the CMHAS(Na). Lesser moisture can be explained by the lower hydrophilicity of the CM(H) groups compared to the CM(Na) groups.

6.2.5.2.5 Relative solubility

Addition of highly hydrophilic CM(Na) groups of to the starch generates an increase of the relative solubility in cold water. This CMHAS(Na) presents a good water solubility (figure 6.4) at DS above 0.18 (with relative solubility of about 93.5 %). Even at very low DS (0.09), the 65% relative solubility of CMHAS(Na) was considerably higher when compared to the insoluble HAS_{IPA} (relative solubility lesser than 2.5%) and to the poorly soluble HAS_{NaOH} (relative solubility slightly less than 20%). The low solubility of the HAS_{IPA} further confirmed that its properties were similar to those of the native HAS which is insoluble in cold water. Furthermore, the higher solubility of the HAS_{NaOH} compared to that of HAS_{IPA} showed that the crystalline starch structure was altered during the synthesis of CMHAS(Na). Indeed, under alcohol-alkaline conditions, the hydroxyl groups of the starch chains (-OH) are probably converted into alkoxide groups (-O⁻) disrupting the hydrogen bound between the GU causing extensive swelling of the starch granules (Chen et Jane, 1994a, 1994b) leading to the breakup of crystalline structure by uncoiling and dissociation of the double-helical chains. After neutralization, the starch chains were reported to formed single-helical complexes with alcohol (V-type pattern). The significant decrease of the relative solubility of CMHAS(Na) when placed into 0.1M HCl seems related to the protonation. The solubility of the acid form of CMHAS(H) was markedly low in both water and 0.1M HCl media. This behavior fits well with characteristics of non-dissociated carboxylic acid (Heinze et Koschella, 2005). Solubility of CMHAS(H) in both solutions increased with the increase of the DS as for (but less evident) the CMHAS(Na). For CMHAS(H), the noticeable increase in relative solubility at highest DS of 1.74 was probably due to the high amount of CM groups that can increase the hydration of the CMHAS chains through hydrogen association between carboxylic group and water leading to higher hydration and solubilisation.

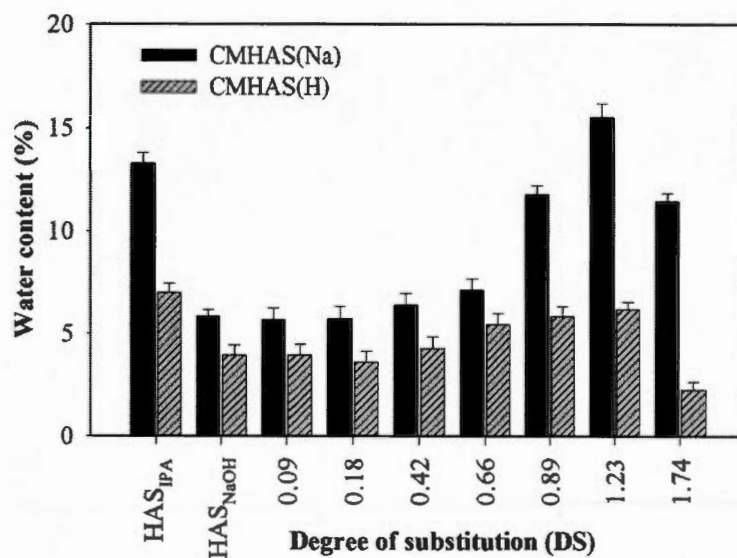


Figure 6.3 Water content (%) of CMHAS(Na) and CMHAS(H) particles.

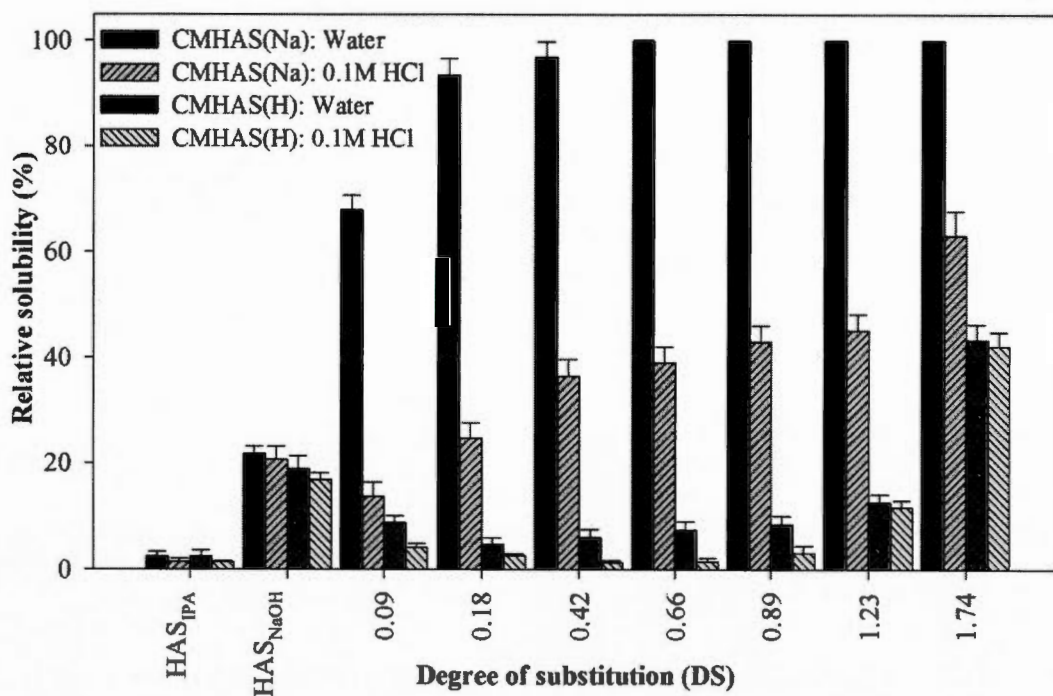


Figure 6.4 Relative solubility (%) of CMHAS(Na) and CMHAS(H) in nanopure water (pH 7.0) and in HCl 0.1N (pH 1.0) dried powders.

6.2.5.3 CMHAS tablets characterisation

6.2.5.3.1 Physical characterization of tablets

Direct compression properties of CMHAS are mainly related to the plastic deformation of the particles under strength leading to formation of bonds between the surface of the deformed particles by the action of distance forces (van der Waals, hydrogen bonds), solid bridges and mechanical interlocking (Adolfsson, Olsson et Nyström, 1997 ; Nystrom et Karehill, 1996). For a specific compression force, a decrease in \bar{D} , an increase of the particle roughness, and optimal water content will result in a higher bonding surface area between the deformed particles and, subsequently, in a higher tablet strength (Korhonen *et al.*, 2002). Particles deformation and association were assessed by the thickness of the tablets. Figure 6.5a and b revealed that the thickness of the CMHAS tablets can not be correlated to their crushing strength. Indeed, the thickness of CMHAS tablets decreased from a DS of 0.09 to 0.18 and remained similar for a DS of 0.18 to 0.66 while the crushing strength decreased, suggesting additional contributions of elastic deformation at these DS. The thickness of the CMHAS tablets continued to decrease with increasing DS to reach the minimum crushing strength value at a DS of 0.89, followed by a considerable increase at a DS of 1.23. Further increase of the DS (1.74), produced thinner tablets with higher crushing strength. These results suggested that CM groups or the modification of the CMHAS chain structure according to the DS, may play a role in the compaction properties of CMHAS. No significant difference was observed between the CMHAS(Na) and the CMHAS(H) tablets thickness and crushing strength indicating that only limited physical modifications occurred during the acid treatment for a DS up to 0.66. At DS higher than 0.89 increased crushing strength of the CMHAS(Na) versus CMHAS(H) tablets may be due to the difference of the water content (figure 6.3). In fact, water can participated at stabilization by hydrogen bonding, and can act like a plasticizer during the compression of plastic deforming polymer (Amidon et Houghton, 1995 ; Gupta *et al.*, 2005 ; Sun, 2008). The friability of CMHAS tablets decreased with increasing tablet crushing strength (figure 6.5b, c). All CMHAS tablets showed low friability (< 1%), except for 0.89 DS, where low crushing strength resulted in high friability. These results show that both CMHAS(Na) and CMHAS(H) with low DS (< 0.18) and CMHAS(Na) with high DS (>1.23), have good compression properties, significantly better than the HAS_{IPA} control.

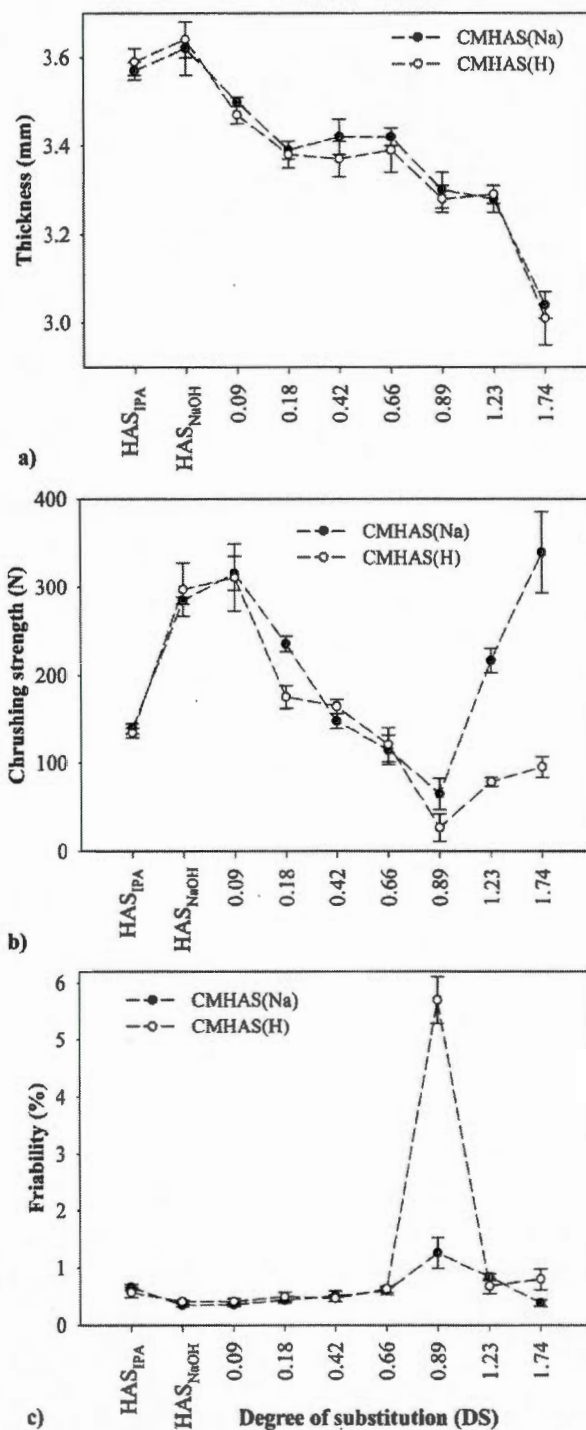


Figure 6.5 a) Thickness ($n = 6$), b) crushing strength ($n = 6$) and c) friability ($n = 2$) of CMHAS(Na) and CMHAS(H) monolithic tablets (500 mg, diameter 12 mm) loaded with acetaminophen (20 % w/w).

6.2.5.3.2 *In vitro* drug release properties

Figure 6.6 and figure 6.8 present the dissolution profiles in SGF and SIF media obtained for CMHAS(Na) and CMHAS(H), respectively. Figure 6.9 presents the dissolution profiles obtained for CMHAS(Na) in SIF with pancreatin (containing α -amylase) preparation (Pan). In each of these figures, an insert presents the 90% drug release time ($T_{90\%}$) and a table insert presents the kinetic constants, k_1 and k_2 (eq. (6.7)) obtained by non linear regression ($R^2 > 0.95$ and $p\text{-value} < 0.01$). The Fickian release exponent (m) used in this study (0.445) was an average value obtained from the correlation of Peppas and Sahlin (1989) with the minimal and maximal CMHAS tablet thickness (figure 6.5a). These statistic assumptions were not used for profiles obtained from the CMHAS(H) with a DS of 1.23 tablets in SIF (fig. 8b) where a high burst effect induced a lack of fitting to the model ($R^2 < 0.4$). Furthermore, for fast dissolution release profiles (90% release in less than 15 min), kinetic constants were not determined since insufficient data available.

The mechanism and the rate of drug release from a hydrophilic polymer matrix can be a function of water permeation, polymer swelling, drug dissolution and diffusion, and matrix erosion (Colombo *et al.*, 2000). These factors can affect the gel network structure and strength due to physical properties of the polymer itself, the polymer chain-chain interaction and polymer chain-solvent interactions. Each dissolution test with HAS_{IPA} as tablet matrix resulted in rapid drug release due to a fast erosion (about 10 min) of the tablet. On the other hand, HAS_{NaOH} showed pH independent sustained release over 15 h probably related to the formation of a strong gel-layer by hydrogen bonding between the hydroxyl groups of the soluble gelled starch chains (figure 6.4). For HAS_{NaOH}(H) faster drug release and higher constants were obtained compared to those of the HAS_{NaOH}(Na) due to a prominent burst effect. However, after full matrix hydration (7 h), differences in dissolution profiles between the two HAS_{NaOH} (Na, H) disappeared.

Figure 6.6a shows a non-monotonous relationship of the $T_{90\%}$ release from CMHAS(Na) with the DS in SGF. Such non-monotonous dependency release rate versus DS of CMHAS(Na) was not found in SIF (figure 6.6b). At low DS in SGF, the formation of the gel-layer seems favoured by hydrogen bonds between hydroxyl groups, hydroxyl group with CM groups and

between protonated CM groups (increasing with the DS). Increasing drug release rate in SGF for DS (0.09 to 0.42) can be due to higher water content in the outer gel-layer and thus enhancing water permeation inside the matrix which increases the drug diffusion through the gel-layer and the swelling of the matrix as shown by the increase of the k_1 and k_2 constants (figure 6.6a - table insert). For moderately low DS, the higher hydrogen association between the polymer chains by dimerization of protonated CM groups (COOH) was not sufficient to counterbalance the swelling/erosion forces with the penetration in the gel-layer of the dissolution medium, due to higher solubility of CMHAS(Na) in SGF (figure 6.4). The formation of a gel-layer appeared stronger with higher DS up to a DS of 1.23, and was associated to a decrease of both k_1 and k_2 constants. These results also showed that tablet strength appeared to have only a limited influence on the drug release properties for CMHAS(Na) with high DS. Indeed, despite the fact that CMHAS(Na) tablets with a DS of 0.89 presented the lowest crushing strength (figure 6.5b), they did not show a faster dissolution rate in SGF. For CMHAS(Na) tablets with a DS of 1.74, with the highest tablet crushing strength, the reduction of the $T_{90\%}$ was probably due to continuous dissolution of the gel-layer induced by a marked increase of the chain solubility in SGF at this DS (figure 6.4).

The dissolution profile of the CMHAS(Na) tablet with a DS of 0.09 presented a significant discontinuity (figure 6.6a) in the drug release rate after 4.75 h in the SGF. A higher drug dissolution rate in the gel-layer can enhance the drug concentration and more water penetration inside the gel-layer inducing a higher swelling of the polymer chains (Colombo *et al.*, 1999). In our case, if the swelling kinetics of the polymer chain is low and the strength of the gel-layer is high, as shown by the slow drug release before 4.75 h for the CMHAS(Na) at DS of 0.09, the increased amount of dissolved drug in the gel-layer and dissolution medium can increase the osmotic pressure inside the gel-layer, thus, at a certain time, accelerating the release rate. This phenomenon seems to be specific to this DS since no other dissolution profile had shown such discontinuity. This discontinuity in SGF was not the result of or did not induce the so-called "cracking" phenomenon as was reported elsewhere with CMHAS with low DS in SIF, since tablet and gel-layer integrity were maintained intact before and after the discontinuity (figure 6.7c, d). In fact a rapid and significant loss of gel-layer integrity was observed only for the HAS_{NaOH} tablets in all dissolution media. For the DS 0.09

CMHAS(Na) tablet, a low surface cracking appears only after 7h in the SGF (figure 6.7d) and also in SIF (not shown) probably resulted from the low amount CM groups which can induce non-uniform polymer chain swelling. The presence of CM groups can alter the hydrogen bonding between the hydroxyl groups involved of the V-type structure (Sarko et Wu, 1978) by higher hydration of the CM groups causing higher swelling of the regions closer to CM groups compared to unsubstituted regions. For the HAS_{NaOH} tablet, this cracking probably resulted from differences between axial and radial swelling of the polymer chain due to nonuniform tablet hydration. At higher DS (≥ 0.18), no cracking was observed since the gel-layer of these tablets slowly dissolved in SIF or eroded with the hydration front advancing inside the matrix due to the higher hydration of the gel-layer associated with the increase of the DS. As explanation, a typical shape of CMHAS(Na) tablet with a DS of 1.23 is presented in figure 6.7. However, this tablet cracking did not induce modification of the drug release mechanism, shown by the continuous dissolution profile of HAS_{NaOH} tablets and the almost identical kinetic constants before and after the discontinuity of DS 0.09 CMHAS(Na) (figure 6.6a) since the drug was released from the gel-layer before the cracking occurred. Nevertheless, for other drugs with different release mechanisms this eventual cracking at low DS can induce uncontrolled and unpredictable drug release rates through the gastrointestinal tract, undesirable for medical treatment. Therefore, a minimal DS, affording enough hydration of the tablet and uniform swelling is necessary for the use CMHAS(Na) synthesised in non aqueous media as controlled delivery excipient. This minimum DS can be equal to or slightly higher than 0.1 since at a DS of 0.09 the cracking of the gel-layer occurred late during the dissolution tests and was relatively low compared to the cracking of the HAS_{NaOH}.

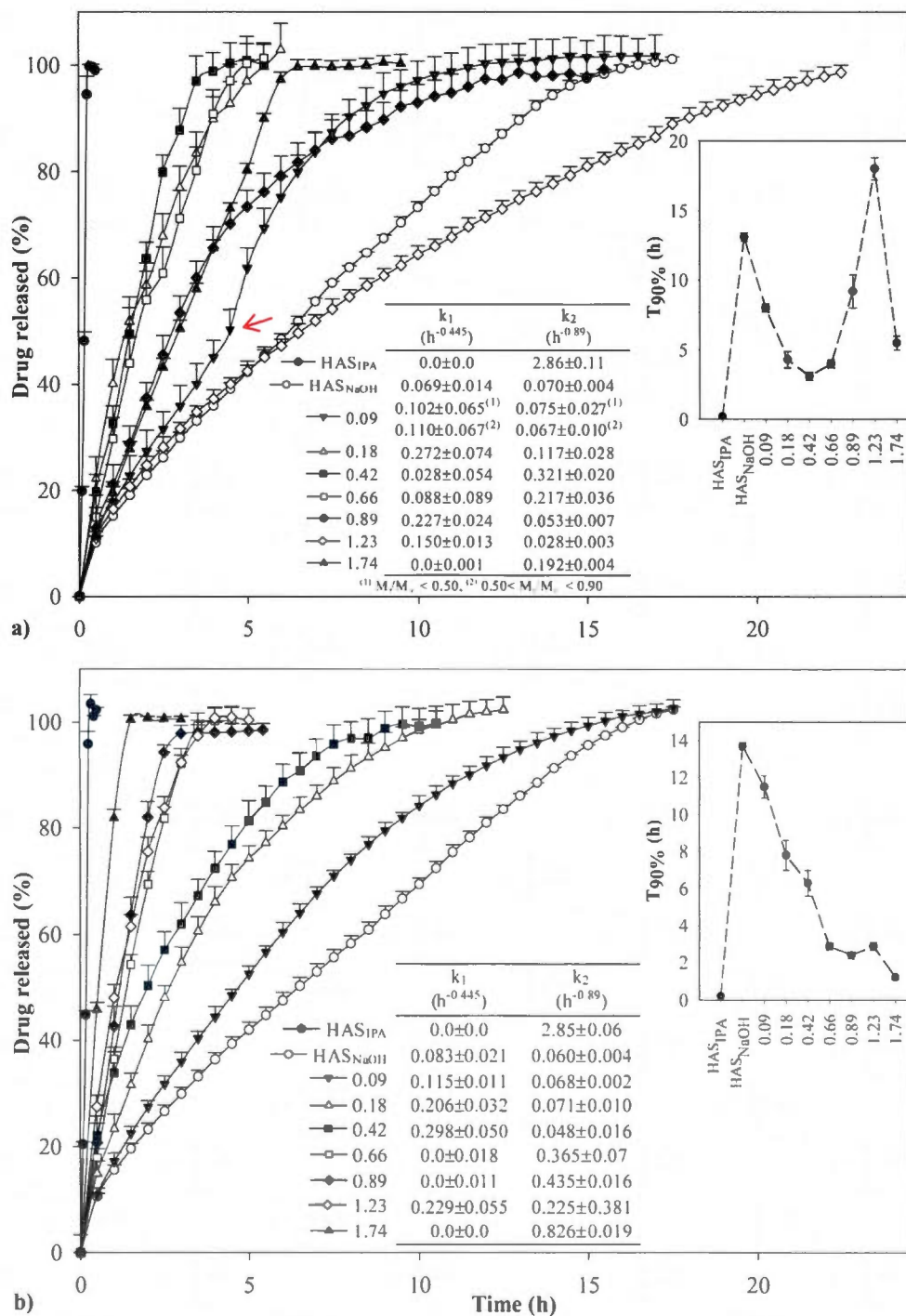


Figure 6.6 Dissolution profiles of acetaminophen from CMHAS(Na) tablets (500 mg, 20 % w/w loading) in: a) simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2) and b) pancreatin-free simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8).

The increase of drug release rates in SIF (pH 6.8) from CMHAS(Na) tablets with increased DS (figure 6.6b) is probably due to higher hydration of the gel-layer and increased repulsive forces between dissociate CM groups ($-\text{COO}^-$). Indeed, from a DS of 0.09 to 0.42 the decrease of the $T_{90\%}$ was associated with lower gel-layer strength due to increasing hydration in the gel-layer and therefore increased diffusion rate of the drug (k_1). At higher DS (0.66 and more), the drug release was accelerated by fast erosion of the gel-layer probably enhanced by higher repulsive forces between CM groups ($-\text{COO}^-$) as shown by the marked increase value of k_2 and the close to zero value of the constant k_1 (fig.6b – table insert). This DS of 0.66 seems allowing the dimerization of the CM groups in SGF (figure 6.6a) sufficient to counterbalance the swelling/erosion force in the gel-layer of the tablets.

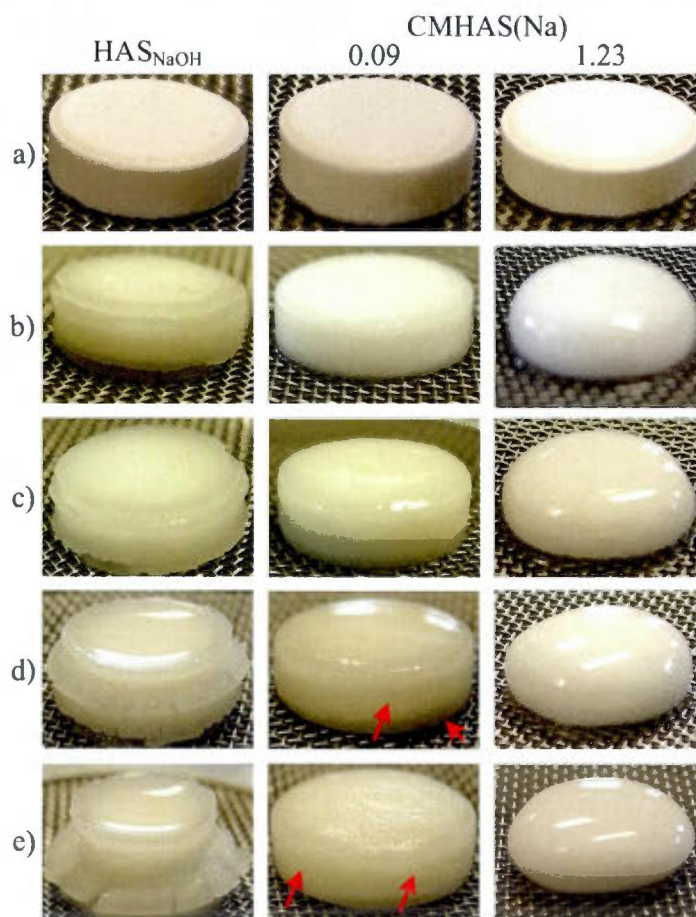


Figure 6.7 Physical appearance of typical tablets of HAS_{NaOH} and CMHAS(Na) with a DS of 0.09 and 1.23 tablets incubated in SGF after: a) initial (0 h), b) 3 h, c) 5 h, d) 7 h and e) 9 h.

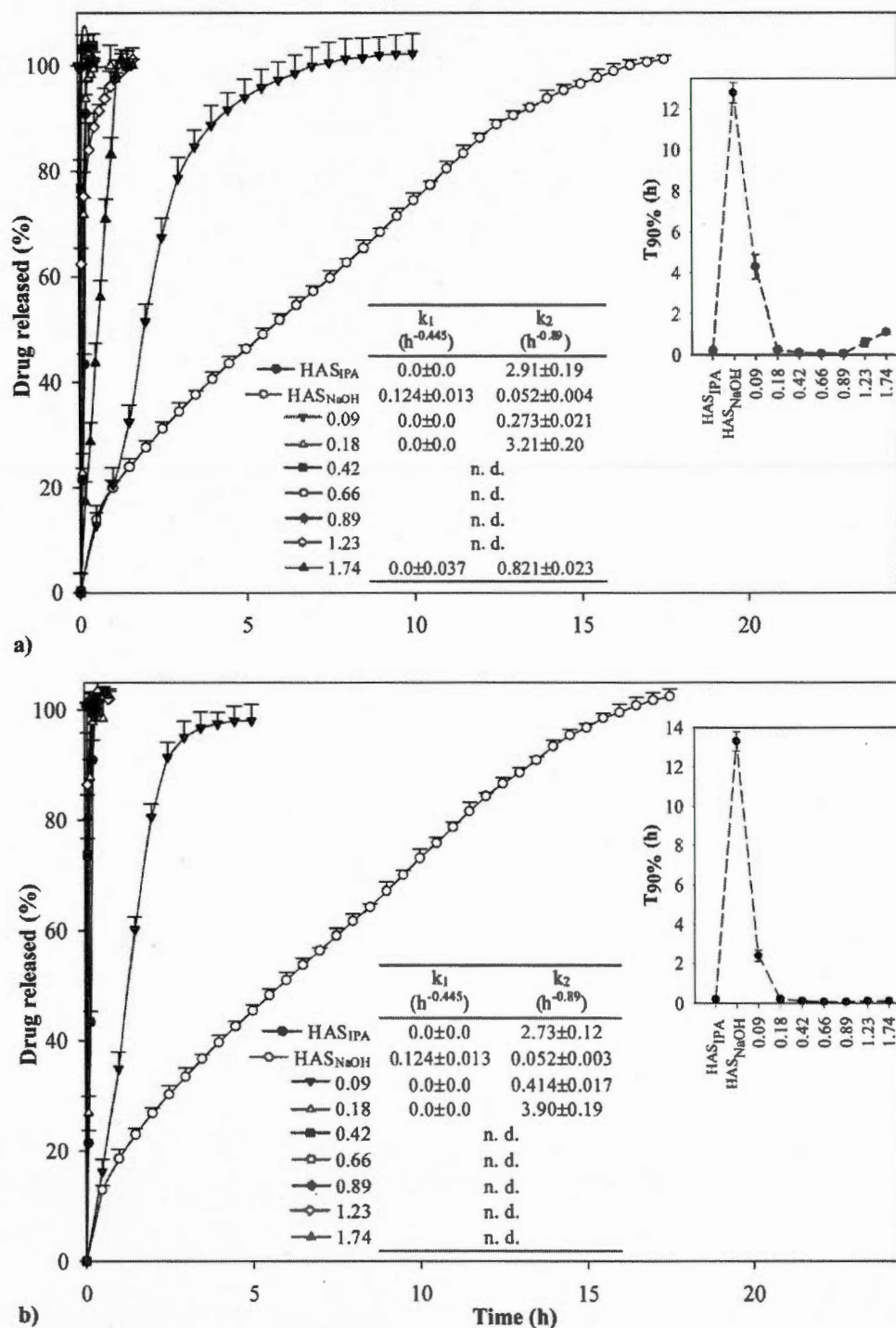


Figure 6.8 Dissolution profiles of acetaminophen from CMHAS(H) tablets (500 mg, 20 % w/w loading) in: a) simulated gastric fluid (SGF, pH 1.2) and b) pancreatin-free simulated intestinal fluid (SIF, pH 6.8).

Overall, CMHAS with high DS (≥ 0.66) showed slower release in SGF than in SIF. In SGF higher attractive interchain hydrogen bonding from the dimerized protonated CM groups and the lower swellability of the polymer caused reduced water penetration and slower drug release rate, whereas the repulsive forces between ionized CM groups ($-\text{COO}^-$) and the Na^+ with its hydration sphere enhance the release rate in SIF. However, CMHAS with lower DS (≤ 0.42), where repulsive interactions between CM groups or hydration are low, showed faster release in SGF than in SIF. The small difference in solubility of acetaminophen (Takahashi *et al.*, 2005) in SGF (21.3 mg/mL) and in SIF (17.8 mg/mL), was not sufficient to explain dissolution results for CMHAS(Na) at low DS.

The drug release from CMHAS(H) tablets with DS of 0.18 and higher (figure 6.8) was very fast, resulted from the rapid disintegration of the tablet in both dissolution media. The low solubility of CMHAS(H) chains in both media (figure 6.4), the low water content (figure 6.3) and reduced tablet strength at high DS (> 0.89) (figure 6.5b) allow fast water penetration inside the matrix, annihilating the cohesive forces between the particles and inducing a faster swelling without formation of a gel network controlling the drug release. The only exception was for DS of 0.09 in both dissolution media and for 1.74 DS in SGF. For DS 0.09, the slower swelling rate allowed the formation of a weak gel-layer mainly from hydrogen bonding between hydroxyl groups, as for the $\text{HAS}_{\text{NaOH}}(\text{H})$. For DS 1.74, a significant increase of the solubility (figure 6.4) of CMHAS(H) can explain the lower dissolution rate in SGF since the solubilisation of the chains will allow the formation of hydrogen association between protonated CM groups and thus the formation of a gel-layer. Differently to CMHAS(Na) with a DS of 0.09 and a DS of 1.74, the corresponding CMHAS(H) presents a lower drug release rate in SGF than in SIF. Increasing the solubility of CMHAS(Na) chains allows the formation of the drug release controlling gel-layer. The presence of the Na^+ ion induced stabilization of the gel-layer in SIF. At low DS (under 0.42), stabilization of the gel-layer was probably due to a reduction of the osmotic pressure inside the gel, explained by the Donnan equilibrium (Khare et Peppas, 1995). Indeed, in a gel network with weak immobile charge ($-\text{COO}^-$) the presence of solubilized Na^+ mobile counterions, inside the gel network of the CMHAS(Na) tablet resulting from the dissociation of the CM groups in SIF, reduced the osmotic pressure and thus the water penetration inside the gel-layer owing to slower drug

release rate compared to the drug release rate from CMHAS(Na) tablet in SGF. At high DS (above 0.66), stabilization of the gel-layer was probably due to the stabilization of the forces between dissociated CM groups through ionic interaction and/or the Na^+ ion (Mulhbachter, Ispas-Szabo et Mateescu, 2004 ; Nabais *et al.*, 2007).

Finally, in order to evaluate the influence of α -amylase on CMHAS, the drug release kinetics from the CMHAS(Na) tablets were evaluated in SIF medium containing Pancreatin (Pan) (figure 6.9). The hydrolytic action of α -amylase is expected to be proportionally reduced with the increase of DS due to steric hindrance of CMHAS substrate. The access to α -amylase active site is supposed limited by the presence of the CM groups (Kwon *et al.*, 1997). The comparison of figure 6.6b and figure 6.9 showed that the $T_{90\%}$ was reduced by 31% for the HAS_{NaOH} , 24% for DS 0.09, 27% for DS 0.18 and 20% for DS 0.42 under the bio-erosion action of α -amylase. This faster release caused by α -amylase was not directly proportional to DS since its action mechanism appears also as function of its diffusion through the hydrated gel-layer (Dumoulin, Cartilier et Mateescu, 1999). At higher DS (> 0.66), no significant differences were observed between the dissolution profiles of the CMHAS(Na) tablets in the two SIF media (with and without Pan) since their drug release properties in SIF were already driven by a faster dissolution mechanism.

6.2.6 Conclusion

The aim of this study was to investigate the influence of the DS, on the physical and drug release properties of CMHAS produced in non-aqueous medium. This synthesis allows carboxymethylation at high DS up to 1.23 with yields as high as 72%. Further increase of the DS to 1.74 was also obtained with two consecutive reactions steps but with significantly lower yields (43.5%). The DS and conversion of CMHAS(Na) to CMHAS(H) had a major impact on the physical properties of particles and of resulting tablets, CMHAS appearing as a versatile excipient for direct compression. Dissolution tests performed in SGF, SIF and Pan with acetaminophen as drug model showed CMHAS to be a pH sensitive hydrophilic matrix. Only the sodium salt form CMHAS(Na) seems suitable for oral solid dosage forms for controlled release since the CM(Na) groups showed adequate properties and capacity to form gel-layer in SGF and gel network in SIF. The CMHAS(Na) at low DS (between 0.1 and 0.2)

can be used as excipient for sustained release formulations. The advantage of CMHAS(Na) consisted in possibility to adjust the release profiles in function of DS and to ensure an increased resistance of tablets to bioerosion from α -amylase. The CMHAS(Na) with high DS, (between 0.9 to 1.2) can be an excipient of choice for delayed release since the drug dissolution rate in SGF was significantly lower than in SIF. The faster dissolution in SIF appears mostly controlled by pH rather than by α -amylase since drug release mechanism is already driven by faster swelling and erosion mechanism.

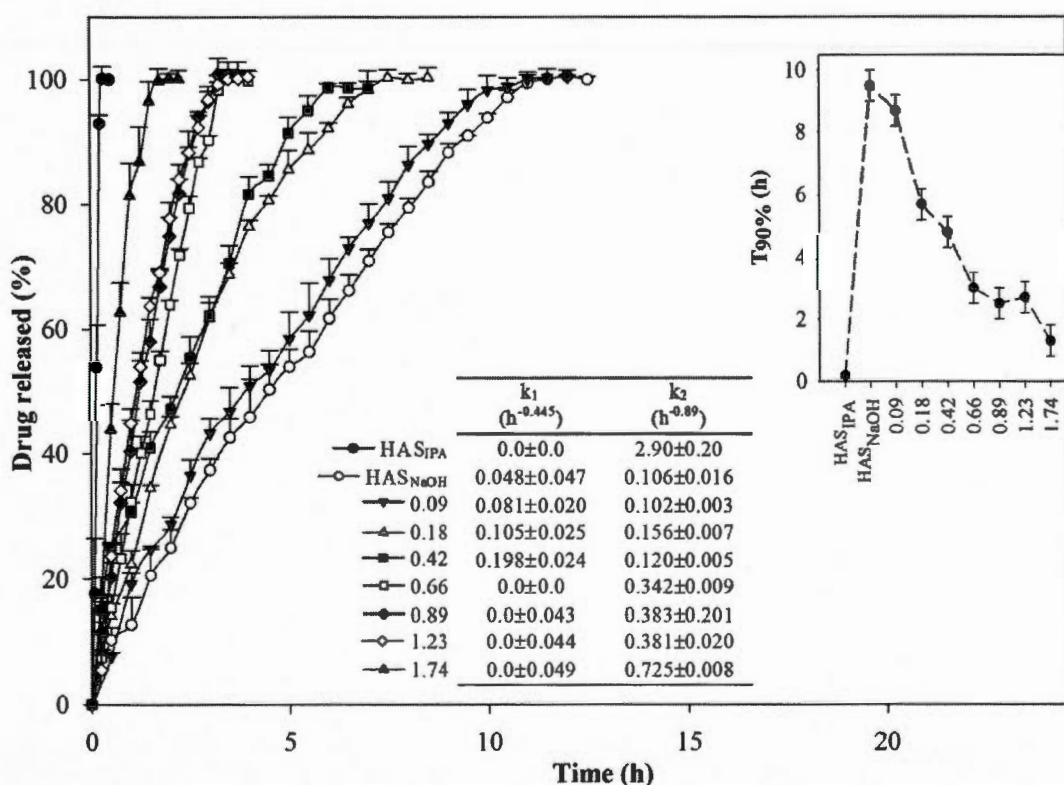


Figure 6.9 Dissolution profiles of acetaminophen from CMHAS(Na) tablets (500 mg, 20 % w/w loading) in simulated intestinal fluid with pancreatin (Pan, pH 6.8).

6.2.7 Acknowledgements

A Ph. D. graduate studentship from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Corealis Pharma Inc. (Montreal, Canada) awarded to M. Lemieux is gratefully acknowledged. Thanks are also due to Corealis Pharma Inc. for providing technical support for this work.

CHAPITRE VII

LIGNÉE CELLULAIRE NCI-N87 COMME MODÈLE DE LA BARRIÈRE ÉPITHÉLIALE GASTRIQUE POUR L'ÉTUDE DE LA PERMÉABILITÉ DES MÉDICAMENTS

7.1 Présentation de l'article 3

Ce chapitre présente une étude de faisabilité sur l'utilisation de la lignée cellulaire NCI-N87 comme barrière épithéliale gastrique modèle pour l'évaluation de la perméabilité gastrique des médicaments. Bien que le sujet de cette communication ne traite pas directement du sujet de cette thèse, soit le développement et l'utilisation des CMA comme excipient pharmaceutique multifonctionnel pour des formulations orales solides, elle s'inscrit dans le corps de celle-ci par le fait que cette étude a permis, à la lumière actuelle des résultats, le développement d'un outil de caractérisation *in vitro* qui sera utilisé subséquentement pour l'évaluation des propriétés des MS-CMA présentée au chapitre suivant (chapitre VIII). L'auteur de cette thèse a trouvé opportun d'inclure cette communication étant donnée la nouveauté de l'emploi de la lignée cellulaire NCI-N87 comme outil d'évaluation de la perméabilité gastrique des médicaments ou de caractérisation des interactions des barrières épithéliales gastriques avec des formes solides.

Selon la meilleure connaissance des auteurs de cette courte communication, il n'existe actuellement pas de méthode de caractérisation de la perméabilité gastrique des médicaments au moyen d'une lignée cellulaire immortalisée. Dans le but d'obtenir un outil *in vitro* relativement simple à préparer et à utiliser, à la lumière d'une recherche dans la littérature scientifique, nous avons émis l'hypothèse que la lignée cellulaire gastrique NCI-N87

posséderait les caractéristiques nécessaires (par exemple la formation d'une monocouche et de jonctions serrées, la survie des cellules postconfluentes, la résistance à de faibles pH) lorsque cultivée à postconfluence sur des supports poreux pour évaluer la perméabilité gastrique des médicaments sous des conditions simulant celles prévalant dans l'estomac humain.

Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai tout d'abord déterminé les conditions et les paramètres de culture qui permettaient de maximiser la TEER des monocouches de cellules NCI-N87. J'ai par la suite vérifié que les monocouches de cellules NCI-N87 cultivées sous ces conditions optimales exprimaient deux protéines, l'E-cadhérine et la ZO-1, caractéristiques des jonctions serrées, soit les protéines. J'ai ensuite déterminé le gradient de pH apical-basolatéral maximal sous lequel les barrières épithéliales composées par les cellules NCI-N87 conservaient une TEER élevée et demeuraient imperméables à un marqueur d'intégrité (Lucifer Yellow) des monocouches couramment utilisé avec d'autres barrières épithéliales modèles. J'ai finalement évalué la perméabilité gastrique de ce marqueur ainsi que de deux autres principes actifs modèles, la caféine et la furosémide, en fonction de différents gradients de pH apical-basolatéral. Les résultats obtenus furent communiqués au moyen du manuscrit présenté ci-dessous et au moyen d'une communication par affiche présentée.

Il est à noter que la réalisation de ce manuscrit aurait été impossible sans la participation de M. Frédéric Bouchard qui a fourni un soutien technique pour démarrer et maintenir la lignée cellulaire NCI-N87, participé à l'élaboration et l'optimisation des méthodes expérimentales et rédigé la section « Immunofluorescence » du manuscrit. La participation de Pre Joanne Paquin qui a fourni des conseils ainsi que des espaces physiques de laboratoire pour réaliser les expérimentations impliquant les cellules NCI-N87 a également permis la réalisation de ce manuscrit, tout comme la participation active du Pr. Mateescu et du Dr Gosselin qui ont suivi l'évolution des expérimentations ainsi que des résultats obtenus. Finalement, les personnes nommées ci-dessus ont révisé le manuscrit.

7.2 NCI-N87 cell line as gastric epithelial barrier model for drug permeability assay

Marc Lemieux^a, Frédéric Bouchard^a, Patrick Gosselin^b, Joanne Paquin^a, Mircea Alexandru Mateescu^{a,*}

^a Department of Chemistry-Biochemistry and Centre Pharmaqam, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec), Canada, H3C 3P8

^b Corealis Pharma Inc., 200 boulevard Armand Frappier, Laval (Québec), Canada, H7V 4A6

* Corresponding authors:

Mircea Alexandru Mateescu
Department of Chemistry,
Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec), Canada, H3C 3P8
Phone: +1 514 987 4319,
Fax: +1 514 987 4054.
E-mail address: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Joanne Paquin
Laboratory of neurobiochemistry
Department of Chemistry,
Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec),
Canada, H3C 3P8
Phone: +1 514 987 4990;
Fax: +1 514 987 4054.
E-mail: paquin.joanne@uqam.ca

Article publié dans « Biochemical and Biophysical Research Communications », 2011, vol. 412, p.429-434.

7.2.1 Résumé

L'objectif de cette étude était d'évaluer la lignée cellulaire humaine NCI-N87 comme modèle pour étudier la perméabilité gastrique de médicaments sous des conditions de pH de l'estomac. Les conditions optimales qui ont mené les cellules NCI-N87 à se différencier en une barrière épithéliale gastrique différenciée typique étaient une densité d'ensemencement de $2,5 \times 10^5$ cells/cm² sur des filtres et maintenue dans un médium RPMI-1640 enrichi de sérum jusqu'à 18 à 27 jours postconfluence. Les monocouches de cellules résultantes exhibaient des valeurs de résistance électrique transépithéliale (RETE) modérément élevées d'environ 500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, des cellules ayant une morphologie polygonale exprimant les protéines E-cadhérine et ZO-1 à leur surface de contact, et produisaient des agglomérats de mucus. Les monocouches peuvent supporter une diminution de pH apical de 7,4 à 3,0 avec le pH basolatéral maintenu à 7,4. Les coefficients de perméabilité apparente (P_{app}) des composés modèles ont été évalués dans la direction apicale à basolatérale et basolatérale à apicale sous différents gradients de pH. Les monocouches étaient imperméables au marqueur d'intégrité « *Lucifer Yellow* » (faible P_{app} de 0,3-1,1 $\times 10^{-6}$ cm/s). Les P_{app} de la furosémide (0,4-1,5 $\times 10^{-5}$ cm/s) dépendaient faiblement du gradient de pH, mais demeuraient modérés. Les P_{app} de la caféine étaient plus élevés et insensibles au changement de pH. La lignée cellulaire NCI-N87 fournit un outil *in vitro* utile pour évaluer la perméabilité gastrique des médicaments et l'absorption sous les conditions physiologiques de l'estomac humain.

Mots-clés : Barrière épithéliale gastrique NCI-N87, résistance électrique transépithéliale, jonctions serrées, perméabilité gastrique des médicaments, coefficient de perméabilité apparente, gradient de pH.

7.2.2 Importance de la recherche

- Monocouches de cellules NCI-N87 comme modèle de l'épithélium gastrique.
- Monocouches de cellules NCI-N87 exhibent des caractéristiques typiques d'une barrière épithéliale gastrique.
- Barrière fonctionnelle avec un gradient de pH jusqu'à 3,0_{apical} – 7,4_{basolatéral}.
- Le transport des médicaments au travers des monocouches de NCI-N87 est en accord avec l'hypothèse de coefficient de partage par le pH.
- La lignée cellulaire NCI-N87 fournit un outil *in vitro* pour évaluer la perméabilité gastrique des médicaments.

7.2.3 Abstract

The objective of this study was to evaluate the human NCI-N87 cell line as a model for gastric permeability drug studies under pH conditions of the stomach. The optimal conditions that led NCI-N87 cells to form a typical differentiated gastric epithelial barrier were a seeding density of 2.5×10^5 cells/cm² on porous inserts and growth in serum-complemented RPMI-1640 medium until 18 to 27 days postconfluency. The resulting cell monolayers showed moderately high transepithelial electrical resistance (TEER) values of about 500 Ω -cm², cells of polygonal morphology expressing E-cadherin and ZO-1 proteins at their contact surfaces, and production of mucus clusters. The monolayers withstood apical pH of 7.4 down to 3.0 with the basal pH fixed at 7.4. The apparent permeability coefficients (P_{app}) of model compounds were evaluated in the apical-to-basolateral and basolateral-to-apical directions under different pH gradients. The monolayers were impermeable to the integrity marker Lucifer Yellow (low P_{app} of $0.3\text{--}1.1 \times 10^{-6}$ cm/s). The furosemide P_{app} ($0.4\text{--}1.5 \times 10^{-5}$ cm/s) were slightly dependent on pH but remained moderate. The caffeine P_{app} ($4.2\text{--}5.0 \times 10^{-5}$ cm/s) were higher and insensitive to pH changes. The NCI-N87 cell line provides a useful *in vitro* tool to assess gastric drug permeability and absorption under physiological conditions prevailing in the human stomach

Keywords : NCI-N87 gastric epithelial barrier, transepithelial electrical resistance, tight junctions, gastric drug permeation, apparent permeability coefficient, pH gradient

7.2.4 Research highlights

- NCI-N87 monolayers provide a gastric epithelium model.
- NCI-N87 monolayers display characteristics typical of a gastric epithelial barrier.
- The barrier functions for pH gradients up to $3.0_{\text{apical}} - 7.4_{\text{basolateral}}$.
- Transport of drugs across NCI-N87 monolayers agrees with the pH-partition hypothesis.
- NCI-N87 cell line provides an *in vitro* tool to assess gastric drug permeability.

7.2.5 Introduction

Acidic and very weakly basic drugs can be absorbed in the human stomach by passive diffusion, by convective or aqueous channel-mediated transport as well as via an active receptor-mediated transport (Hogben *et al.*, 1957 ; Talukder et Fassihi, 2004). It is known that the gastric drug absorption is generally lower than the intestinal drug absorption. However, gastric absorption can be desirable for drugs formulated for local action in the stomach. The gastric drug residence time can substantially increase when drugs are administered in prandial conditions or delivered using gastroretentive dosage forms. There exist several cell lines which, when grown on porous inserts, constitute standard models to predict the *in vivo* intestinal drug permeability and absorption (Tavelin *et al.*, 2002). However, to the best knowledge of the authors, there is no standard model based on a human gastric cell lines established to predict *in vitro* the gastric drug permeability and absorption. Some gastric cell lines have been developed by the immortalization of human primary epithelial cells or by the cloning of human gastric cancer cells such as the NCI-N87 cell line (Chailler et Ménard, 2005 ; Okayama *et al.*, 2000). They are used in the fields of gastric physiology and pathology and our hypothesis is that they should be also useful to evaluate gastric drug permeability.

The objective of this study was therefore to determine the feasibility of using the differentiated NCI-N87 human carcinoma gastric cell line (Park *et al.*, 1990) grown on porous inserts as an *in vitro* model to assess the gastric drug permeability under conditions similar to those in the human stomach. This cell line was selected for this study since it is readily available from American Type Culture Collection and was reported to exhibit a more differentiated epithelial phenotype over three other common gastric cell lines (AGS, Hs746t and KATO-III) (Basque *et al.*, 2001). The NCI-N87 cells possess unique properties relevant to the study of gastric drug permeability, such as the capacity to form tightly coherent monolayers expressing E-cadherin and zonula occludens-1 (ZO-1), the stability of the epithelial morphology for up to 10 days post-confluency, the expression of gastric mucin-6 protein suggesting a mucopeptic phenotype, the production of high levels of gastric zymogens and the capacity to efficiently secrete gastric lipase and pepsinogen (Basque *et al.*, 2001).

7.2.6 Materials and methods

7.2.6.1 Cell culture

NCI-N87 cells were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA) and were used between passage numbers 25 to 34. The cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI-1640), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), or DMEM: nutrient mixture F-12 (DMEM/F12) (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA). Each medium was with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Premium from Wisent, St-Bruno, QC, Canada), 1% sodium pyruvate, 4.5 g/L D-glucose (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), and the antibiotics penicillin (50 U/mL) and streptomycin (50 µg/mL) (Hyclone Laboratories). The culture medium was changed every two days until cells reached approximately 70-80% confluency. Cells were harvested using 0.25% trypsin-0.53 mM EDTA solution (Hyclone Laboratories) and were seeded at approximately 5×10^4 cells/cm² in 75 cm²-flasks (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA).

7.2.6.2 Preparation and pH gradient treatment of NCI-N87 monolayers

To determine the optimal seeding density for the generation of tight monolayers, harvested NCI-N87 cells were seeded onto translucent polyethylene terephthalate (PET) ThinCert inserts (1.13 cm² growth area, 0.4 µm pores, 10⁸ pores/cm², Greiner bio-one, Monroe, NC, USA) at densities varying between 1.0×10^5 and 5.5×10^5 cells/cm². Cells were grown in complete RPMI-1640, DMEM or DMEM/F-12 medium to evaluate culture medium effects. Medium (0.6 mL in the insert and 1.5 mL in the well) was replaced every two days.

To study effects of apical-to-basolateral (A_p-B_l) pH gradients on the transepithelial electrical resistance (TEER), post-confluency NCI-N87 monolayers grown on porous inserts were processed as follows, at 37 °C throughout. They were first pre-incubated for 1 h into a rotating orbital shaking incubator ROSI 500 (Thermolyne, Dubuque, IA, USA; 100 rpm) in pH 7.4 Hank's balanced salt solution (HBSS) containing 1.26 mM calcium chloride, 0.49 mM magnesium chloride, and 0.41 mM magnesium sulphate. This HBSS was provided to both the apical and basolateral sides. The apical HBSS was then replaced by HBSS of the

desired pH and incubation pursued into the shaking incubator for 3 h. The apical and basolateral HBSS were both replaced by complete RPMI-1640 and cells returned to the growth incubator for 24 h. RPMI-1640 was renewed and incubation resumed. The pH of HBSS was adjusted with 25 mM HEPES (for pH 7.4 experiments), 20 mM acetate (for pH 5.0) and 1, 10 or 100 mM HCl (for pH 3.0, 2.0, 1.0 respectively). Incubation (3 h) into HBSS pH 3.0 on the apical side and into HBSS pH 7.4 on the basolateral side with both HBSS not supplemented with calcium and magnesium salts was also evaluated as control. The TEER was measured periodically during pre-incubation (initial values), the 3 h pH gradient treatment, and up to 36 h post-treatment. Results are expressed as % of initial TEER.

7.2.6.3 TEER measurements

The TEER ($\Omega \text{ cm}^2$) of NCI-N87 monolayers was measured at 37 °C using a Millicel ERS-2 Voltohmmeter (Millipore, Bedford, MA, USA). The raw values were corrected by subtracting the intrinsic electrical resistance (Ω) of the filter and buffer medium and were multiplied by the insert surface area (cm^2).

7.2.6.4 Immunofluorescence

Cells were seeded on sterile glass coverslips at a density of about $2.5 \times 10^5 \text{ cell/cm}^2$ and cultured for up to 25 days post-confluency in RPMI-1640 renewed at every two days. Cells were fixed in -20 °C methanol for 10 min, rinsed with phosphate buffer solution (PBS), blocked for 60 min at room temperature (RT) in PBS containing 1.5% horse serum (Cansera International, Etobicoke, ON, Canada), and successively incubated with the primary and secondary antibodies, for 60 min each at RT. Primary antibodies were goat anti-human ZO-1 and rabbit anti-human E-cadherin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and secondary antibodies were donkey anti-goat IgG conjugated with rhodamine and goat anti-rabbit IgG conjugated with fluorescein (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Cells washing and antibody dilutions (1:50) were done with PBS containing 1.5% horse serum. Cells were finally counterstained with 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 300 nM in PBS) for 5 min at RT and mounted with Prolong Gold antifade reagent (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

7.2.6.5 Microscopy

For morphology, cells monolayers were grown onto transparent PET ThinCert inserts (1.13 cm² growth area, 0.4 µm pores, 2×10⁶ pores/cm², Greiner bio-one), and fluorescent staining was visualized using a Nikon Eclipse Ti microscope (Nikon Canada, Mississauga, ON) equipped with phase contrast and epifluorescence optics. Photomicrographs were acquired using a Digital Sight DS-Qi1Mc camera and NIS-Elements 3.0 software (Nikon Canada).

7.2.6.6 Drug transport studies

Drug transport across NCI-N87 monolayers was studied under different A_p-B_l pH gradients, generated as described in section 2.2, with some modifications, as follows. After the 1 h pre-incubation period, the HBSS solutions were changed on both the apical and basolateral sides. To study transport in the A_p-B_l direction, fresh HBSS of the desired pH was supplemented with the drug and provided to the apical side (donor compartment) and fresh HBSS pH 7.4 was provided to the basolateral side (receiver compartment). For transport study in the opposite direction (B_l-A_p), the drug was added in fresh basolateral HBSS pH 7.4 while the fresh apical HBSS at desired pH was drug-free. The initial drug concentration in the donor compartment was 100 µM for the Lucifer Yellow (LY) dye (Sigma-Aldrich) and 500 µM each for furosemide and caffeine (Sigma-Aldrich). Due to its low solubility in acidic media, furosemide was initially dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The final concentration of DMSO in the donor compartment was 0.5% (v/v). The TEER value was measured before and after each experiment. Aliquots of the incubation media were taken periodically, over 2 h, from the receiver compartments to analyse the drug concentration and determine the transport parameters. The aliquots were replaced with an equal volume of the appropriate HBSS buffer.

LY concentration was determined by fluorimetry (λ_{exc} 428 nm, λ_{em} 536 nm) using an Infinite 200 PRO microplate reader (Tecan, Maennedorf, CH). Furosemide and caffeine concentrations were analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography, according to (Semaan *et al.*, 2005) and (Franeta *et al.*, 2002) respectively, using an Agilent series 1100 chromatograph, a ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (4.6 × 150 mm, 5 µm) and a diode-array detector (Agilent Technologies, Germany).

The apparent permeability coefficient (P_{app} , cm/s) of each model drug was calculated according to the following equation:

$$P_{app} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \left(\frac{1}{AC_0} \right) \quad (7.1)$$

where dQ/dt is the steady-state rate of appearance of drugs in receiver side ($\mu\text{mol/s}$), A is the surface area of the monolayer (cm^2) and C_0 is the initial compound concentration in the donor compartment (μM). For each experiment, the mass balance was determined as described in (Hubatsch, Ragnarsson et Artursson, 2007), averaged $89.0 \pm 5.6\%$, $78.3 \pm 6.0\%$ and $91.7 \pm 6.8\%$ respectively for LY, furosemide and caffeine (mean \pm SD, $n=36$ each).

7.2.6.7 Statistical analysis

Results are expressed as the means \pm SD for "n" independent studies and "m" replicates per study. Statistical analysis was performed by ANOVA with Tukey-Kramer multiple comparison tests (significance level of $p < 0.05$) using Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

7.2.7 Results

7.2.7.1 Optimization of NCI-N87 monolayers culture conditions

The effects of the culture medium and of the cell seeding density on the formation of an epithelial barrier by NCI-N87 monolayers were first evaluated by TEER measurements. Time course studies revealed that higher TEER values were achieved for cultures grown in RPMI-1640 (figure 7.1A) than in DMEM/F-12 (figure 7.1B) or in DMEM (figure 7.1C) complete medium. In RPMI-1640, once cells reached confluency (at about 10, 6 and 4 days respectively following seeding with 1.0×10^5 , 2.5×10^5 and 5.5×10^5 cells/ cm^2), the TEER continuously increased until day 18 post-confluency and reproducibly reached a stability plateau that lasted until day 27. Then, the TEER further increased until it abruptly dropped down. There was a high variability between cultures in the height and duration of this additional increase as well as in the dropping moment. For this reason, the period covering

day 18 to day 27 post-confluency was judged as the most appropriate for further characterization. Figure 7.1D compares the TEER values obtained by different cultures at 18 days post-confluency. The highest TEER values, about $500 \Omega\text{-cm}^2$, were obtained at a seeding density of $2.5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ in RPMI-1640 and represent about four times the values obtained with DMEM/F-12 and DMEM media. Cultures were also compared morphologically. All three culture media stimulated the production of mucus clusters evenly distributed over the apical side of cell monolayers (figure 7.1E). The apparent size and area coverage of these clusters in RPMI-1640 medium were similar to or higher than those observed in the other media. Cell-cell contacts were examined by the immunofluorescence of E-cadherin, marker of adherens junctions, and ZO-1, marker of tight junctions (figure 7.1F). In RPMI-1640 cultures seeded at $2.5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$, cells already had a characteristic epithelial polygonal shape at day 0 post-confluency, as revealed by E-cadherin signal. E-cadherin was evenly distributed on the plasma membrane of all cells which established intimate contacts between each other throughout the entire culture. A co-localization of ZO-1 with E-cadherin was observed starting at 5 days post-confluency and was almost completed at day 10. Overall, the results showed that NCI-N87 cells can form a differentiated epithelial barrier which is optimized by growing $2.5 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ in complete RPMI-1640 until 18 to 27 days post-confluency. These conditions were used for the remaining experiments.

7.2.7.2 Resistance of NCI-N87 monolayers to gastric pH

In vivo, the apical side of the stomach epithelium faces very low pHs. We thus determined the pH limits that can be withstood by NCI-N87 monolayers by varying the apical pH while maintaining the basolateral pH at 7.4 (figure 7.2). There was a small decrease (less than 10%) of the TEER values when cell monolayers were incubated for several hours in HBSS pH 7.4. This could be due to the absence of the serum and/or nutrients since TEER returned to initial values by replacing HBSS by complete RPMI-1640 in the cultures. Lowering the apical pH to 5.0 induced a modest decrease of TEER compared to pH 7.4. With an apical pH of 3.0, the TEER immediately decreased to about 40% of the initial values but remained stable during the treatment and returned to initial values once cultures were put back in complete RPMI-1640 indicating the viability of the cells. It is worth of mention that, despite this reduction, the TEER values at apical pH 3.0 were still two fold higher than those

observed at pH 7.4 in DMEM/F12 and DMEM media (figure 7.1B and C). Lastly, there was an irreversible decrease of the TEER values by 85% or less when monolayers were exposed to apical pH values of 2.0 and 1.0, or to apical pH 3.0 in the absence of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions (known to be essential in maintaining tight junctions integrity). The absence of these ions probably loosened the cell junctions whereas the very acidic pH probably affected the viability of the NCI-N87 cells.

7.2.7.3 Drug transport across NCI-N87 monolayers

Three model compounds, LY, furosemide and caffeine, were selected to study the A_p - B_l and B_l - A_p directional transport of drugs across NCI-N87 monolayers under various pH gradients, from $7.4_{\text{A}_\text{p}}\text{-}7.4_{\text{B}_\text{l}}$ to $3.0_{\text{A}_\text{p}}\text{-}7.4_{\text{B}_\text{l}}$. The LY, a compound with a very low permeability, is commonly used as a control to assess various types of cell monolayer integrity (Hubatsch, Ragnarsson et Artursson, 2007). Furosemide, a weak acid, and caffeine, a weak base, are drugs that can be absorbed in the stomach through predominantly a passive transport across the gastric mucosa (Eteng *et al.*, 1997 ; Klausner *et al.*, 2003). Caffeine is highly permeable and furosemide of intermediate permeability (US Department of Health and Human Services, 2000). P_{app} values of the compounds in each direction across the cell monolayers (figure 7.3) were calculated using eq. (7.1) where the steady-state rates of appearance of drugs in receiver side (dQ/dt) were determined by linear regression of the cumulative amount of compound transported per unit of time (figure 7.4). The low P_{app} values of LY for the apical pHs of 7.4, 5.0 and 3.0, are in accordance with the expected very low permeability of the compound. For LY and furosemide, permeability values were higher at pH 3.0 and for the A_p - B_l versus B_l - A_p direction. The P_{app} values of furosemide were in accordance with the expected intermediate permeability compared to the two other compounds. Caffeine showed high and similar permeability values at all pHs and in both directions. The NCI-N87 monolayer model thus faithfully rendered the relative permeability of the model compounds for apical pH values varying from 3.0 to 7.4.

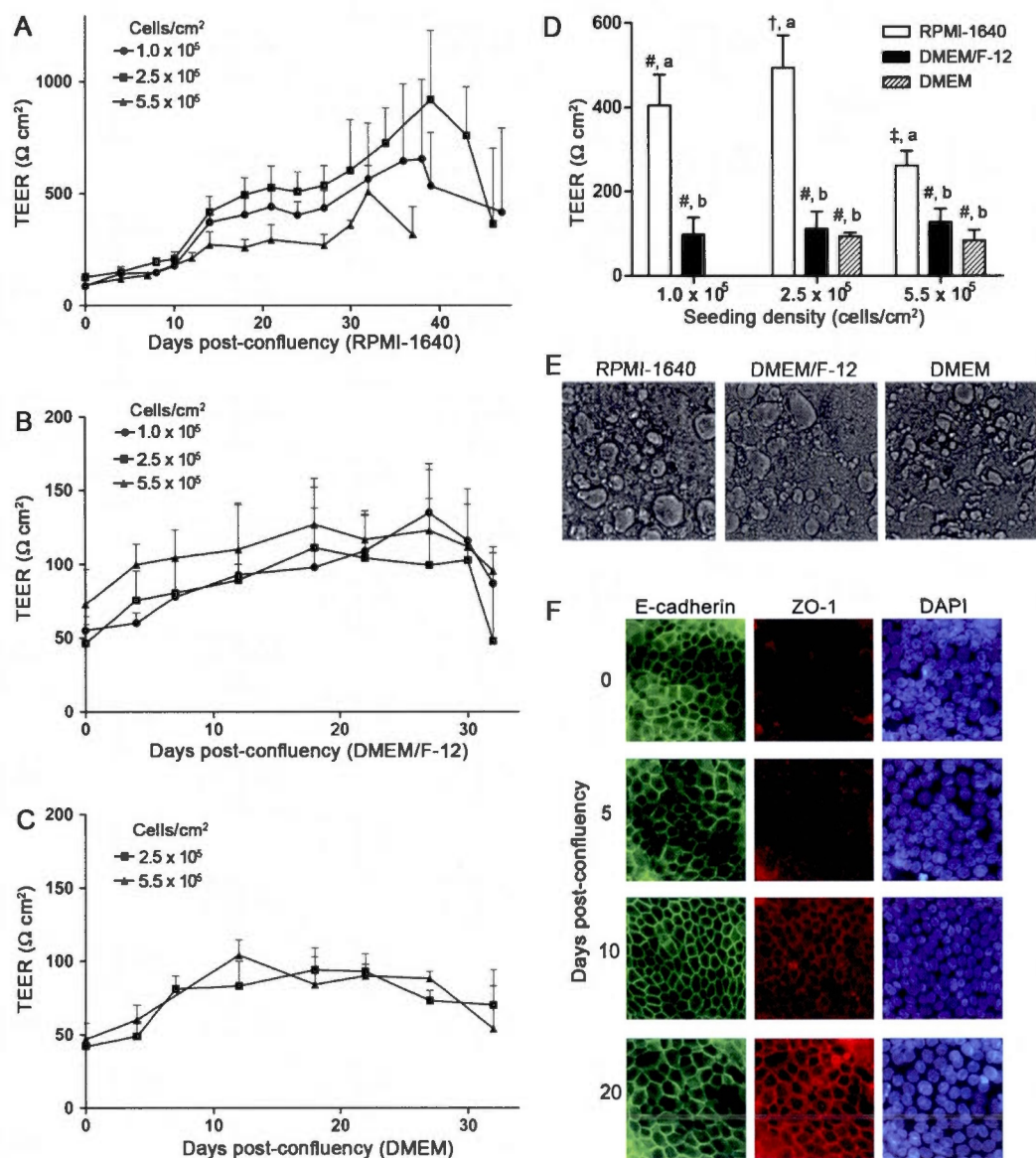


Figure 7.1 Optimization of NCI-N87 cell culture conditions on porous inserts. Time course of TEER evolution (means \pm SD) at various seeding cell densities in complete (A) RPMI-1640 ($n = 4$, $m = 4$), (B) DMEM/F-12 ($n = 2$, $m = 4$) and (C) DMEM ($n = 2$, $m = 4$) culture media. (D) Comparison of TEER at 18 days post-confluency (means \pm SD). For a given cell density, culture media sharing the same letter are not statistically different, and for a given culture medium, cell densities sharing the same symbol are not statistically different ($p < 0.05$). (E) Phase contrast micrographs (100X), at 20 days post-confluency, of monolayers grown in the indicated complete medium. The seeding density was 2.5×10^5 cells/cm². (F) Immunofluorescence micrographs (600X) of E-cadherin and ZO-1 from cultures seeded at 2.5×10^5 cells/cm² and grown in complete RPMI-1640. Nuclei were counterstained with DAPI.

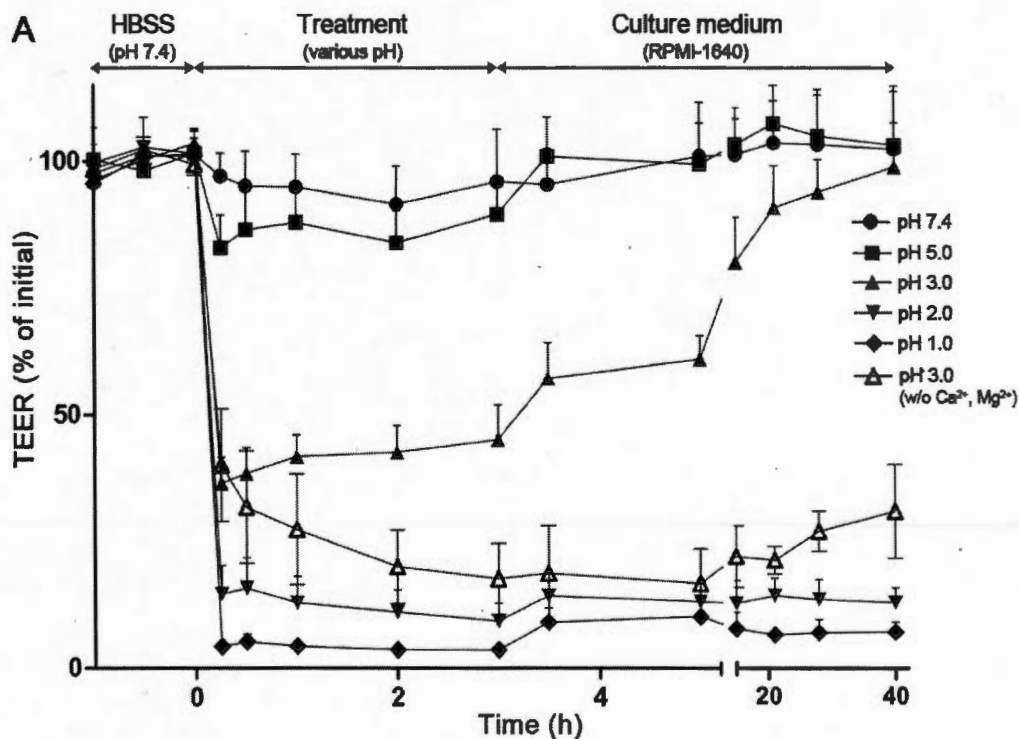


Figure 7.2 Effect of the apical pH on the TEER of NCI-N87 monolayers. Time course of TEER variation in cultures pre-incubated for 1 h in pH 7.4 HBSS (apical and basolateral sides), then treated for 3 h in HBSS with the apical pH varying from 1.0 to 7.4, and further grown for about two days in complete RPMI-1640 medium. Treatment also involved the exposition of the apical side to pH 3.0 HBSS without Ca²⁺ and Mg²⁺ (pH 3.0 w/o Ca²⁺, Mg²⁺). The TEER measurements (means \pm SD for $n = 3$, $m = 3$) are expressed as % of initial values which averaged 512 ± 84 (SD) $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

7.2.8 Discussion

This study shows that NCI-N87 cell monolayers can be used as an *in vitro* model to assess the gastric permeability of drugs. Indeed, upon optimization of the culture conditions, these monolayers were shown to be formed via a functional epithelial arrangement of cells expressing adhesion proteins at their surface, producing mucus clusters and maintaining TEER for apical pHs varying from 3.0 to 7.4. In addition, P_{app} values measured at these pHs indicated that the monolayers reproduced the relative *in vivo* gastric permeability of model drugs. Significantly lower TEER values, less than $125 \Omega \cdot \text{cm}^2$, were obtained when monolayers were grown in DMEM/F-12 or DMEM based culture medium (figure 7.1)

suggesting incomplete/impaired epithelium formation. Like for other epithelial monolayer models (Volpe, 2008), small changes in the culture conditions of NCI-N87 cells can modify the cell phenotype as well as the integrity and therefore permeability of the cell monolayers. A careful characterization of the NCI-N87 monolayer prior to experimentation will ensure reproducibility of the permeability results.

As shown by Basque *et al.* (2001), NCI-N87 cells had a significant mucigenous activity, including the secretion of gastric specific mucin-6 glycoprotein. Interestingly, our results indicate that the culture medium influences the mucus secretion by the NCI-N87 cells, with RPMI-1640 offering the best conditions (figure 7.3E). Mucosity was observed with the establishment of cell polarity, in agreement with a highly differentiated epithelial phenotype (Rodriguez-Boulan et Nelson, 1989). The greater maturing influence of RPMI-1640 compared to the other media was also reflected in the higher TEER values of the cell cultures (figure 7.1). A mucus layer over the surface of cells could contribute with the formation of tight junctions to the achievement of high TEER values. The stable TEER plateau observed between day 18 and day 27 post-confluency in RPMI cultures was followed by a further and highly variable TEER increase (figure 7.1). We think that this could be due to the uneven formation of cell multilayers.

The gastric pH is typically around 1.5 in the fasted state and 5.0 in the fed state. It reaches a peak of 6.2 within 2 to 4 h after a meal and then goes back to its basal level of 2.0 (Dressman *et al.*, 1990 ; Russell *et al.*, 1993). The gastric pH exhibits intra- as well as inter-subject variations, which may significantly influence the performance of orally administered drugs (Talukder et Fassihi, 2004). To be relevant as a drug permeation evaluation tool, an *in vitro* gastric epithelial barrier should thus be functional over this range of acidic conditions. The functional resistance of NCI-N87 monolayers to apical pH of 3.0 to 7.4 meets these conditions. The TEER diminution at pH 3.0 probably resulted from cells crenation into the acidic environment, which could loosen the tight junction assemblages *in vivo*, bicarbonate secretion and the maintenance of intracellular and interstitial pH, together with mucus production, protect the cell lining of the stomach from autodigestion (Allen *et al.*, 1993). The stabilisation of TEER after the initial drop (figure 7.2) suggests that the NCI-N87 monolayers

possess similar defense mechanisms against acidic conditions. The functional integrity of the NCI-N87 monolayers under these acidic conditions was shown by their impermeability to the LY marker and this, in both transport directions, as revealed by P_{app} values lower than 1×10^{-6} cm/s (figure 7.3A).

The passive bidirectional transport of LY and furosemide was pH dependent (figure 7.3A and B). The P_{app} increase at low pHs could be ascribed to lower TEER values compared to higher pH (figure 7.2). For furosemide, the significant difference between the A_p-B_l and B_l-A_p P_{app} values at apical pH of 3.0 (figure 7.3B) can indicate that the pH itself on either side of the cell monolayer has an impact. The so-called “pH-partition hypothesis” would apply to furosemide. This hypothesis stipulates that ionizable compounds diffuse through biological membranes primarily in their non-ionized form (Yu *et al.*, 1996). Furosemide is a weak acid with a pK_a of 3.8 (Klausner *et al.*, 2003) and, according to the Henderson–Hasselbalch equation, predominantly exists as its non-ionized form at pH 3.0 (an amount 25 000 fold higher than at pH 7.4). Its capacity to pass through the cell membranes is thus be higher on the acidic than on the neutral side of the cell monolayer.

On the other hand, the passive bidirectional transport of caffeine across the NCI-N87 monolayer was found to be insensitive to pH gradients (figure 7.3C). This also agrees with the pH-partition hypothesis. Indeed, caffeine is a weak base but with a first pK_a at 0.6 (Pranker, 2007) and thus predominantly exists under its non-ionized form at any pH from 3.0 to 7.4. Furthermore, the diminution of the monolayer TEER with increased pH gradient did not influence the caffeine P_{app} , suggesting a totally passive transcellular transport.

In conclusion, the data of this study indicate that the commercially available NCI-N87 cell line grown on porous supports can be used as a pertinent *in vitro* model to assess the gastric drug permeability with pH gradients varying from $7.4_{Ap}-7.4_{Bl}$ to $3.0_{Ap}-7.4_{Bl}$. In a further development, a drug permeability scale will be correlated with the *in vivo* drug absorption data. If such correlation will be confirmed, this will strongly support the usefulness of this model.

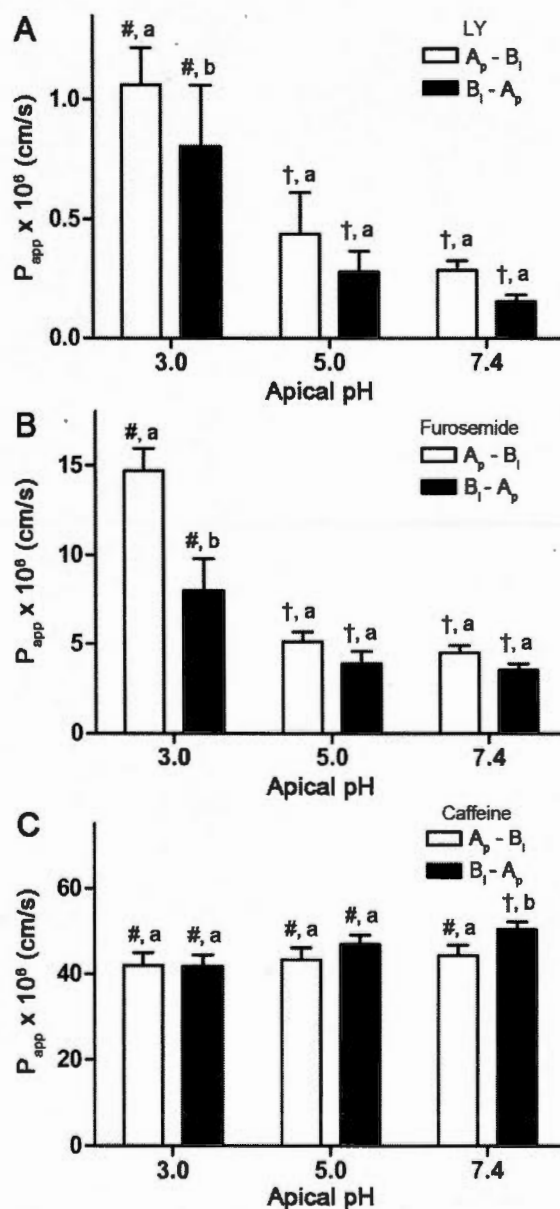


Figure 7.3 Effect of the pH gradient on the P_{app} values of model drugs across NCI-N87 monolayers. Apical to basolateral (A_p-B_l) and basolateral to apical (B_l-A_p) P_{app} values of (A) LY (100 μ M initially in the donor compartment), (B) furosemide (500 μ M) and (C) caffeine (500 μ M) as a function of the apical pH (means \pm SD for $n = 2$, $m = 3$) with HBSS pH 7.4 on the B_l side for all experiments. For a given apical pH, bars sharing the same letter are not statistically different, and for a given direction, bars sharing the same symbol are not statistically different ($p < 0.01$). The TEER measurements are expressed as % of initial values which averaged (\pm SD) 529 ± 81 , 512 ± 75 and 543 ± 78 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ for Lucifer yellow, furosemide and caffeine respectively.

7.2.9 Acknowledgments

The support from MITACS-Accelerate program (Canada) in partnership with Corealis Pharma Inc. (Laval, Canada) and FQRNT (Quebec Nature and Technology Research Fund) and from NSERC (Natural Science and Engineering Research Council of Canada) is gratefully acknowledged. Thanks are due to Bastien Landry and Richard Desmangles (Corealis Pharma) for providing technical support for this work, and to Philippe Ducharme for useful discussions.

7.2.10 Supplementary material

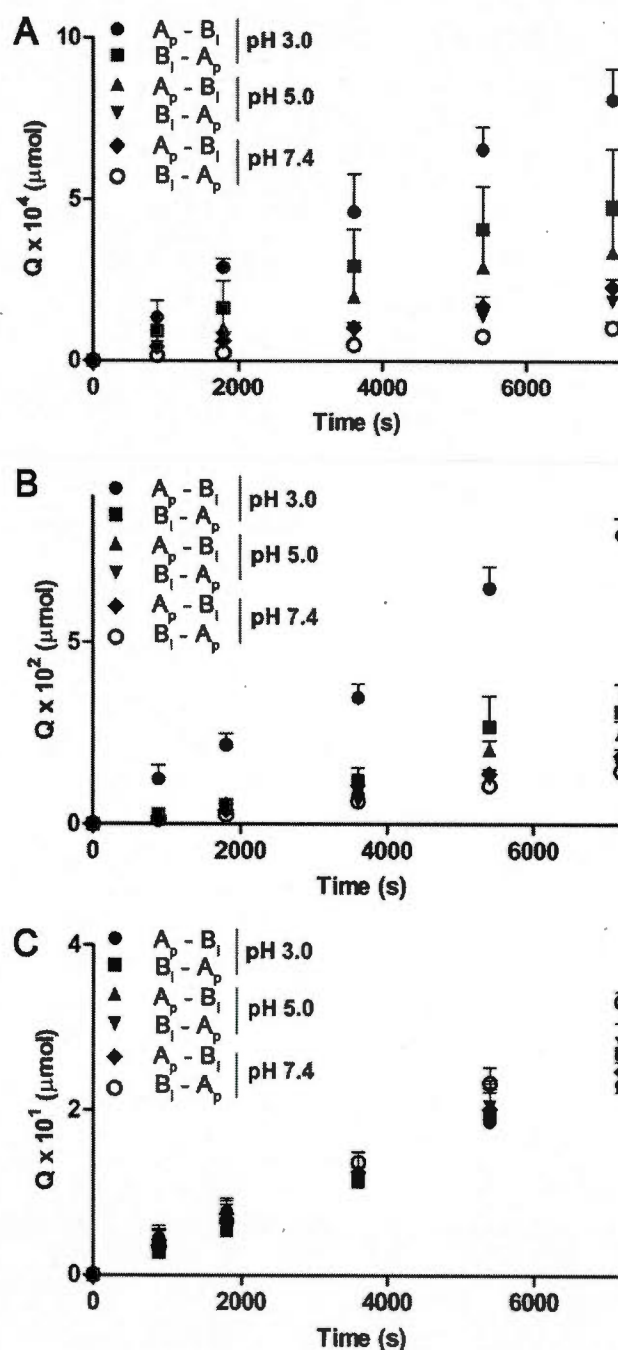


Figure 7.4 Effect of the pH gradient on the transport (kinetics) of model drugs across NCI-N87 monolayers. Quantity (Q) of (A) LY (100 μM initially in the donor compartment), (B) furosemide (500 μM) and (C) caffeine (500 μM) transported in the A_p-B_i or A_p-B_i direction as a function of time (means \pm SD for $n = 2$, $m = 3$).

CHAPITRE VIII

MICROSPHÈRES MUCOADHÉSIVES DE CARBOXYMÉTHYL AMIDON : SYSTÈME GASTRO-RÉTENTIF D'ADMINISTRATION DE MÉDICAMENTS

8.1 Présentation de l'article 4

Le manuscrit présenté dans ce chapitre fait suite à l'étude sur l'augmentation du DS des CMA utilisés comme excipient pour des formes orales solides (chapitre VI), où il fut montré que des valeurs de DS entre 0,9 et 1,2 permettaient d'obtenir des CMA retardant la libération des médicaments en milieu acide. Aussi, il a été observé lors de la synthèse et l'utilisation de ces CMA que ceux-ci possédaient des propriétés adhésives certaines. Ces propriétés correspondent à celles recherchées pour la formulation de certains systèmes d'administration de médicaments gastro-rétentifs, soit spécifiquement les microsphères mucoadhésives (section 8.3). Devant ces faits, il était rationnel de croire que les CMA seraient un excipient de prédilection pour l'élaboration de microsphères mucoadhésives gastro-rétentives.

Ainsi, l'hypothèse principale sur laquelle ce manuscrit repose est que l'augmentation du DS des MS-CMA peut induire une augmentation des propriétés mucoadhésives des MS-CMA en milieu acide par l'accroissement du nombre de liaisons adhésives non covalentes (ponts hydrogènes) entre les groupes CM protonnés et les mucines (glycoprotéines) à la surface de la muqueuse gastrique. Afin de vérifier cette hypothèse avec le plus de rigueur possible dû au fait que les mécanismes de mucoadhésion sont des mécanismes multifactoriels (section 2.2.2), l'objectif de ce manuscrit a été étendu à l'élaboration de microsphères mucoadhésives au moyen de CMA ayant différents DS pour l'administration orale de petites molécules actives. La détermination de l'utilisation la plus appropriée (système d'administration gastro-

rétentif vis-à-vis système d'administration ciblant les intestins) de ces microsphères a été réalisée au moyen de l'évaluation comparative de leurs propriétés physico-chimiques, de libération de médicaments et de mucoadhésion sous des conditions qui imitent celles existantes dans le TGI (acide et neutre) ainsi que leurs interactions avec des modèles cellulaires de barrières épithéliales du TGI (gastrique et intestinale).

Afin de répondre à cet objectif, à partir de CMA avec différents DS préalablement synthétisés, j'ai tout d'abord développé une méthode de production des MS-CMA au moyen de la littérature scientifique et d'essais de plusieurs méthodes de production. À la lumière de ces expérimentations, je n'ai trouvé qu'une seule méthode de production, soit l'émulsion-réticulation, qui permettait d'obtenir des microsphères possédant des propriétés qui permettaient leur utilisation pour les expérimentations subséquentes. Précisément, seuls les microsphères produites par émulsion-réticulation conservaient leur intégrité physique (solubilité limitée) lorsqu'ajoutées dans une solution aqueuse, dû à l'ajout d'un lien physique (réticulation) entre les chaînes de polymères de CMA. Par la suite, j'ai optimisé les paramètres de production des microsphères afin d'obtenir des microsphères ayant approximativement un diamètre de 100 μm et de maximiser leur sphéricité (section 4.5.2). J'ai caractérisé les propriétés physiques et de libération de médicaments des MS-CMA produites. J'ai ensuite caractérisé, au moyen de modèles *in vitro* de la barrière gastrique (NCI-N87, chapitre VII) et de la barrière intestinale (Caco-2), l'influence des MS-CMA sur la RETE des monocouches de cellules et sur le transport de médicaments modèles au travers celles-ci. Avec ces modèles cellulaires, j'ai également évalué le potentiel de toxicité des MS-CMA. Finalement, j'ai caractérisé les propriétés de mucoadhésion des microsphères en utilisant des sections d'estomacs et d'intestins fraîchement prélevées chez des porcs. Les résultats obtenus par ces caractérisations furent communiqués au moyen du manuscrit présenté ci-dessous qui est en voie de soumission pour publication dans la revue *International Journal of Pharmaceutics* (2012) ainsi qu'au moyen de diverses communications par affiche et présentation orale.

Il est à noter que la réalisation de ce manuscrit aurait été impossible sans la participation active du Pr Mircea A. Mateescu et du Dr Patrick Gosselin qui ont suivi l'évolution des expérimentations ainsi que des résultats obtenus, fourni une assistance sur l'élaboration du manuscrit et révisé le manuscrit.

8.2 Carboxymethyl starch mucoadhesive microspheres as gastroretentive dosage form

Marc Lemieux¹, Patrick Gosselin², Mircea Alexandru Mateescu^{1,*}

^a Department of Chemistry-Biochemistry and Centre Pharmaqam, Université du Québec à Montréal, CP 8888, Succ. Centre-ville, Montréal (Québec), Canada, H3C 3P8

^b Corealis Pharma Inc., 200 boulevard Armand Frappier, Laval (Québec), Canada, H7V 4A6

* Corresponding author: Mircea Alexandru Mateescu

Department of Chemistry,
Université du Québec à Montréal,
CP 8888, Succ. A, Montréal (Québec), Canada, H3C 3P8
Phone: +1 514 987 4319,
Fax: +1 514 987 4054.
E-mail address: mateescu.m-alexandru@uqam.ca

Article en voie de soumission à l'« international Journal of Pharmaceutics », (Septembre 2012)

8.2.1 Résumé

Des microsphères de carboxyméthyl amidon (MS-CMA) ont été produites à partir de poudre de carboxyméthyl amidon (P-CMA) possédant des degrés de substitution (DS) de 0,1 à 1,5 afin d'étudier l'influence du DS sur les propriétés physico-chimiques, de libération de médicaments et de mucoadhésion ainsi que leurs interactions avec des modèles des barrières épithéliales du tractus gastro-intestinal (TGI). Les MS-CMA ont été produites par émulsion-réticulation sans (placebo) et avec la furosémide comme principe actif modèle. Les MS-CMA obtenues étaient sphériques avec un diamètre moyen de 90 μm (45-150 μm) et avaient une densité de 1,5 g/cm^3 . L'efficacité de chargement de la furosémide dans les MS-CMA était de l'ordre de 50% et les microsphères étaient amorphes pour tous les DS, chargés ou non. Le DS a eu un impact déterminant sur la reprise d'eau à l'équilibre et les propriétés de libération de médicament des MS-CMA en fonction du pH du milieu environnant. La résistance électrique transépithéliale (RETE) des monocouches de cellules NCI-N87 (gastrique) n'a pas été influencée par la présence des MS-CMA, tandis que celle des monocouches de cellules Caco-2 (intestinal) diminuait avec l'augmentation du DS, mais elles recouvraient leurs valeurs initiales approximativement 15 h post-traitement. L'augmentation du DS des MS-CMA favorisait également la perméabilité de la furosémide au travers des monocouches de cellules NCI-N87 et Caco-2 sous des gradients de pH de 3,0 à 7,4. Les tests de viabilité cellulaire ont indiqué que les MS-CMA, peu importe le DS, n'étaient pas cytotoxiques jusqu'à 10 mg/ml. La mucoadhésion des MS-CMA sur les muqueuses gastriques (condition acide) augmentait avec l'augmentation du DS jusqu'à une valeur supérieure à 55% avec un DS de 1,0, mais décroissait sur les muqueuses intestinales (condition neutre) à une valeur inférieure à 10% avec un DS à partir de 0,1. Les propriétés de libération des médicaments, d'amélioration de la perméabilité des médicaments et de mucoadhésion des MS-CMA suggèrent que les MS-CMA possédant un DS entre 0,6 et 1,0 sont appropriées pour l'élaboration de formes gastro-rétentives d'administration de médicaments.

Mots-clés : Microsphère de carboxyméthyl amidon, propriétés physico-chimique et de libération de médicaments, Caco-2, NCI-N87, résistance électrique transépithéliale, viabilité cellulaire, perméabilité apparente, mucoadhésion, forme pharmaceutique gastro-rétentive

8.2.2 Abstract

Carboxymethyl starch microspheres (CMS-MS) were produced from carboxymethyl starch powder (CMS-P) with a degree of substitution (DS) from 0.1 to 1.5 in order to investigate the influence of DS on physicochemical, drug release and mucoadhesion properties as well as interactions with gastrointestinal tract (GIT) epithelial barrier models. Placebo and furosemide loaded CMS-MS were obtained by emulsion-crosslinking. CMS-MS were spherical with a mean diameter of 90 μm (45-150 μm) and had a density of approx. 1.5 g/cm^3 . The loading efficiency of CMS-MS with furosemide was about 50% and particles were amorphous for all DS with or without loading. DS had an impact on increasing equilibrium water uptake and modulating drug release properties of the CMS-MS according to the surrounding pH. The transepithelial electrical resistance (TEER) of NCI-N87 gastric cell monolayers was not influenced in presence of CMS-MS, whereas that of Caco-2 intestinal cell monolayers decreased with increasing DS but recovered initial values at about 15 h post-treatment. CMS-MS with increasing DS also enhanced furosemide permeability across both NCI-N87 and Caco-2 monolayers at pH gradients from 3.0 to 7.4. The cell viability assays indicated that CMS-MS, irrespective of DS, were not cytotoxic up to 10 mg/ml. Mucoadhesion of CMS-MS on gastric mucosa (acidic condition) increased with the DS up to 55% for a DS of 1.0 but decreased on neutral intestinal mucosa to less than 10% with DS of 0.1. The drug release, permeability enhancement and mucoadhesive properties of the CMS-MS suggest CMS-MS with DS between 0.6 and 1.0 as suitable for gastroretentive oral delivery dosage forms.

Keywords : Carboxymethyl starch microspheres, drug delivery, cell viability, permeability, mucoadhesion, gastroretentive dosage form,

8.2.3 Graphical abstract

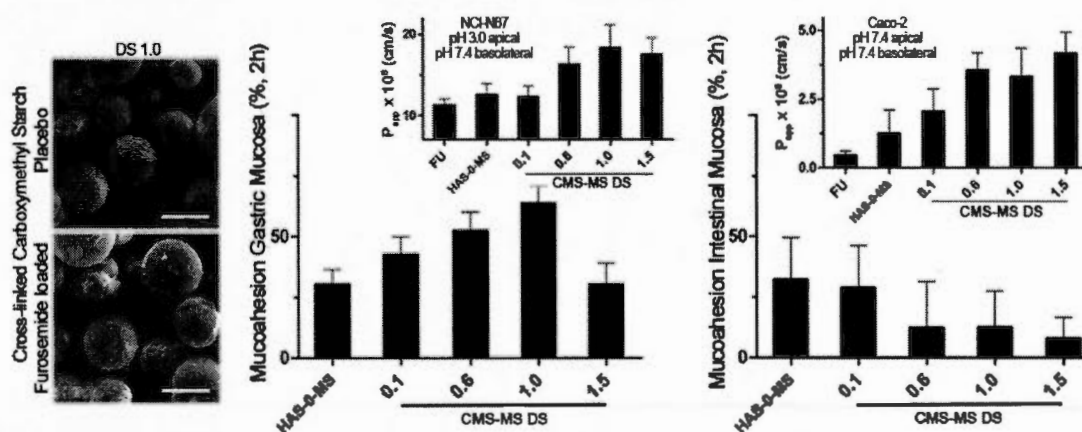


Figure 8.1 Résumé graphique de l'article intitulé « Carboxymethyl starch mucoadhesive microspheres: a gastroretentive dosage form »

8.2.4 Introduction

Gastric drug delivery can be desirable for certain drugs having local action or absorption window in the proximal part of the gastrointestinal tract (GIT), degrading under intestinal enzymatic activities or neutral/alkaline conditions or when administered in prandial conditions (Bardonnet *et al.*, 2006). Microspheres as oral multiparticulate drug delivery system tend to be dispersed in regions of the GIT ensuring a more reliable and reproducible release profile and thus a more uniform drug absorption (Asghar et Chandran, 2006). Mucoadhesive microspheres, through a high surface to volume ratio and an intimate contact with mucus layers, can improve drug absorption; prolong dosage form residence time thus increasing bioavailability of released drug. Mucoadhesivity of the microspheres is dependent of the intrinsic nature of the polymer (molecular weight, flexibility of polymer chains, spatial conformation, swelling/water uptake, charge), of the dosage form properties (size, shape, surface, density, drug characteristics and loading) and of surrounding environment (pH, applied strength/shear, initial contact time, temperature, mucin surface charge, mucin turnover) (Ahuja, Khar et Ali, 1997 ; Andrews, Lavery et Jones, 2009 ; Dodou, Breedveld et Wieringa, 2005). The most investigated mucoadhesive excipients are hydrophilic

macromolecules forming ionic and hydrogen bonds (Peppas, Thomas et McGinty, 2009 ; Smart, 2005). Hydrophilic mucoadhesive microspheres can be tailored to adhere to any human ocular, nasal, buccal, pulmonary, GIT, rectal or vaginal mucosa.

Cross-linked starch due to its cost-effectiveness, large availability, resistance to enzymatic degradation by α -amylase, biocompatibility, biodegradability, non-immunogenicity and mucoadhesive nature (Demirgoz *et al.*, 2000) was considered as excipient for mucoadhesive microsphere drug delivery system (Ahuja, Khar et Ali, 1997 ; Dodou, Breedveld et Wieringa, 2005). Cross-linked starch microspheres were successfully used for nasal or pulmonary drug delivery (Chaudhari, Jadhav et Kadam, 2010 ; Pereswetoff-Morath, 1998) but their high hydration and swelling in GIT fluids had limited their used for oral drug delivery due to poor mucoadhesivity.

Mulhbacher *et al.* (2006) have shown that mucoadhesivity of cross-linked starch at neutral pH can be improved by adding small amount of carboxymethyl groups to starch chains. This carboxymethyl starch (CMS) in its uncross- and cross-linked forms was previously used as hydrophilic anionic excipient for tablet matrix able to control the release of active molecules (Lemieux, Gosselin et Mateescu, 2009, 2010 ; Mulhbacher *et al.*, 2001) and of bioactive agents (Calinescu *et al.*, 2007). The properties of CMS are governed by the degree of substitution (DS) defined as the average number of carboxymethyl group per glucose units (GU) constituting the backbone of starch chains and lie between 0 and 3. CMS can be stabilized by hydrogen bonding between hydroxyl groups, between hydroxyl groups and carboxylic (COOH) groups and between carboxylic groups under acidic conditions or between hydroxyl and carboxylate (COO⁻) groups and between carboxylate groups under neutral conditions (Lemieux, Gosselin et Mateescu, 2009). This study also showed that drug release from CMS of DS from 0.9 to 1.2 was pH-dependent.

The objective of this study was to develop mucoadhesive microspheres using CMS with different DS, to evaluate their physicochemical, drug release and adhesive properties under conditions simulating those prevailing in the GIT (acidic and neutral) and to investigate their interactions with model cells of the GIT epithelial barriers (gastric and intestinal) for the oral

delivery of small molecules. Furosemide (FU) was used as a model drug since it is classified by Biopharmaceutics Classification System (BCS) under class IV and exhibits relatively low and variable overall oral absorption (50-60%) occurring site-specifically in the stomach and upper small intestine (Kaukonen *et al.*, 2007). The low bioavailability of FU is due to its poor solubility at low pH (5-20 µg/ml) and to the involvement of intestinal efflux proteins (Kaukonen *et al.*, 2007 ; Pade et Stavchansky, 1998), despite a moderately high solubility at neutral pH (2.25 mg/ml). FU absorption would benefit from increased residence time in the stomach or small intestine (Davis, 2005). It was formulated with CMS-MS also because FU alone had a low permeability across gastric (NCI-N87) (Lemieux *et al.*, 2011) and intestinal (Caco-2) (Pade et Stavchansky, 1998) epithelial barrier models. Finally, FU was chosen due to its anionic nature (weak acid, pKa 3.8 (Klausner *et al.*, 2003)) that can interfere with the interaction forces between the charged polymer chains.

8.2.5 Materials and methods

8.2.5.1 Materials

High amylose corn starch (HAS) (Hylon VII) was supplied by National Starch (Bridgewater, NJ USA). Cytochalasin D (CD), FU, sorbitan monooleate (Span 80), sodium monochloroacetate (NaMCA) and sodium trimetaphosphate (STMP) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Other chemicals were reagent or HPLC grade and used as supplied.

8.2.5.2 Synthesis of the CMS powder

CMS at various DS were synthesized from HAS as previously described (Lemieux, Gosselin et Mateescu, 2009) except that the NaMCA was slowly added into the reactor at a rate of 2.0 g/min and that the reactor was purged with dry nitrogen (about 200 ml/min) over the 4 h carboxymethylation reaction. The CMS slurries were dried by vacuum drying at 50 °C and – 20 mm Hg for 24 h to obtain several CMS powders (CMS-P). Using a constant glucose unit (GU) / sodium hydroxide (NaOH) ratio of 1.0/2.0 and by varying the NaMCA/GU ratio from 0.15 to 2.00, CMS-P with DS of 0.12 ± 0.01 , 0.59 ± 0.04 , 1.01 ± 0.06 and 1.45 ± 0.08 (n=3) (determined by back titration (Stojanovic *et al.*, 2005)) were obtained. For the remaining of

this study, the DS of the CMS-P and CMS-MS will be referred as 0.1, 0.6, 1.0 and 1.5. As control, non-reacted HAS (hereto called HAS-0) was prepared under the same conditions as CMS but without adding NaMCA to the reactor medium.

8.2.5.3 Preparation of cross-linked CMS-MS and drug loading efficiency

The CMS-MS were produced by an inverse emulsion technique (Atyabi *et al.*, 2006 ; Hamdi, Ponchel et Duchene, 2001) using STMP as cross-linker. For each CMS-MS preparation, the aqueous phase was prepared by dissolving an amount of 5 g of the CMS-P with DS of 0.1 to 1.5 or HAS-0 in 25 g of 1 M NaOH solution and 0.77 g of FU was added to each CMS solution under magnetic stirring at room temperature. Then, 2 g of STMP, dissolved in 5 g of water, was added to each CMS preparation. According to the DS, the CMS/NaOH/STMP ratio varied from 4.7/3.8/1.0 for HAS-0 to 3.1/3.8/1.0 for CMS DS 1.5 where the amount of hydroxyl groups on the GU available for cross-linking was always in excess. Each solution was vigorously stirred for 0.5 min and then degassed for 0.5 min by sonication (Branson 3510, Danbury, CT, USA) under vacuum. The aqueous phase was immediately introduced in 375 ml of an organic phase consisting of cyclohexane / chloroform mixture (80/20 v/v) containing 0.1% w/w of Span 80 at 30 °C in a 1 l jacketed reaction glass vessel (Chemglass, Vineland, NJ, USA) equipped with baffles and servo-controlled speed overhead mixer (Colepalmer 5000-40, Niles, IL, USA) fitted with a Rushton turbine and maintained at 600 rpm to form water in oil emulsion. The cross-linking reaction was continued under these conditions for 4 h. Then, 400 ml of propan-2-ol (isopropyl alcohol, IPA) containing 0.2 M hydrochloric acid (HCl) was added into the emulsion, and the CMS-MS were filtered and recovered on Büchner (grade 50 cellulose filter paper, Whatman, Kent, UK). The loaded CMS-MS (FU-CMS-MS) and unsubstituted high amylose starch microspheres (FU-HAS-0-MS) were washed with IPA and dried in an oven for 12 h at 40 °C. Placebo (PL) CMS-MS and PL-HAS-0-MS were also produced under the same conditions but without adding FU into the aqueous phase.

The CMS-MS FU loading was determined by quantifying the amount of dissolved FU from precisely weighed microspheres into 50 mM phosphate buffer (pH 7.2). The suspension was kept light protected for one hour at room temperature and periodically vortexed for two min.

Finally, the suspension was filtered at $0.45\ \mu\text{m}$ and the FU concentration in filtrate was measured according to Semaan *et al.* (2005) using an Agilent series 1100 high-performance liquid chromatograph equipped with a reverse-phase ZORBAX Eclipse XDB-C18 column ($4.6 \times 150\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$) with guard column and a diode-array detector (Agilent Technologies, Germany). The drug loading efficiency was expressed against the theoretical FU loading.

8.2.5.4 CMS-MS physicochemical properties

8.2.5.4.1 Microspheres morphology and particle size distribution

The morphology of CMS-MS was examined with a Hitachi S-4300SE/N scanning electron microscope (SEM) (Hitachi High Technologies America, Pleasanton, CA, USA), at 20.0 kV and under a magnification of 500X. Samples were coated on metallic stubs using electrically-conductive double-sided adhesive tape and then submitted to gold sputter coating.

The particle size and size distribution of the CMS-MS were determined by optical microscopy using a Leica microscope (model DM2500M, Frankfurt, Germany) interfaced with a color camera (Clemex, model L 2.0C CL-13-211, Longueuil, QC, Canada) and an image analysis software (Clemex Vision PE) as described by Lemieux *et al.* (2009, 2010). At least 2.5×10^3 microspheres were observed under 100X magnification and analyzed by digital image analysis. Particles were then characterized by their volume weighted mean diameter ($D_{4,3}$), cumulative size distribution (D_{10} , D_{50} and D_{90}) and sphericity (Ψ).

8.2.5.4.2 Microspheres Density measurements

The density (ρ) of the CMS-MS was measured via liquid displacement method using hexane since it did not induce shrinkage or swelling of the microspheres and FU was practically insoluble in this solvent (Mota *et al.*, 2009). A sample of precisely weighed dry microspheres (W) was immersed in a graduated cylinder containing a known volume (V_1) of hexane and the suspension was vortexed for one min. The microspheres were let to settle down, and the final hexane volume (V_2) was recorded. Density of CMS-MS was calculated with the equation:

$$\rho_{app} = \frac{W}{(V_2 - V_1)} \quad (8.1)$$

8.2.5.4.3 Water content and equilibrium water uptake

The CMS-MS water content was determined by thermogravimetric measurement using a HR83 halogen moisture analyser (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) at 105 °C until a constant mass was obtained.

The equilibrium water uptake of CMS-MS was determined by measuring the extent of swelling of the microspheres in Hank's balanced salt solution (HBSS) containing calcium chloride (1.26 mM), magnesium chloride (0.49 mM) and magnesium sulphate (0.41 mM) buffered either with 100 mM hydrochloric acid (HCl at final pH 1.0) or 25 mM Hepes (at final pH 7.4). The microspheres were allowed to swell 12 h at 37 °C in an incubator shaking at 50 rpm (New Brunswick scientific Series 25D, Edison, NJ, USA). Then, to remove the equilibrium medium excess, the microspheres suspension was centrifuged (International Equipment Company HN-S II, Needham Heights, MA, USA) at 1000 rpm and the supernatant was carefully removed by aspiration. The swollen microspheres were subsequently weighed (W_{sw}), frozen at -80 °C and then dried by lyophilization (Virtis Company Freeze Mobile 24, Gardiner, NY, USA) at -55 °C and 0.2 mbar for 48 h until a constant mass (W_{dry}) was obtained. The equilibrium water uptake was calculated with the equation:

$$\text{Equilibrium water uptake} = \frac{(W_{sw} - W_{dry})}{W_{dry}} \quad (8.2)$$

8.2.5.5 Structural and thermal properties

8.2.5.5.1 X-ray diffraction

X-ray diffraction patterns were obtained with a Siemens D-5000 diffractometer (Munich, Germany) operating in reflectance mode at a Co-K α wavelength (λ) of 1.789 Å, over an angular range 2θ from 5 to 35° and a scan rate of 2°/min. The recorded diffractograms were smoothed by a local second order polynomial regression (Savitzky-Golay 11-points) using

the software GRAMS/AI v7.0 (Thermo Galactic, Waltham, MA, USA). The X-ray diffractograms of FU, raw materials, PL- and FU-CMS-MS were compared in terms of peak assignments and relative intensities. To avoid the influence of water content on relative peak intensities (Lemieux, Gosselin et Mateescu, 2010), samples were kept at room temperature in a vacuum desiccator containing anhydrous calcium sulphate for two weeks prior to analysis up to a final water contents under 0.5% w/w for all samples.

8.2.5.5.2 Differential scanning calorimetry (DSC)

The FU, raw materials, PL- and FU-CMS-MS were analysed with a differential scanning calorimeter DSC 1 (Mettler Toledo). Samples were heated in perforated crimped aluminum pan from 25 to 250 °C at the heating rate of 10 °C/min under dry nitrogen purge of 50 ml/min. Prior analysis, the samples were dried as previously described in section 8.2.5.5.1.

8.2.5.6 *In vitro* drug release properties

The dissolution kinetics of FU from the CMS-MS matrix (total weight of 400 mg) were evaluated with an USP dissolution apparatus II (Distek 5100, North Brunswick, NJ, USA) at 100 rpm in pH 1.0 and 7.4 HBSS buffer (500 ml, 37 °C). The FU release was measured by UV spectroscopy at 274 nm (HP/Agilent 8453A diode array spectrophotometer, Palo Alto, CA, USA).

8.2.5.7 Cell cultures and preparation of cell monolayers

To assess interactions of CMS-MS with GIT mucosas *in vitro*, two model cell lines were used. The human gastric NCI-N87 (CRL-5822) (Park *et al.*, 1990) and intestinal Caco-2 (HTB-73) (Hidalgo, Raub et Borchardt, 1989) carcinoma cell lines, were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The NCI-N87 and Caco-2 were respectively used between passage numbers 25 to 34 and 33 to 42. The NCI-N87 cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI-1640) (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Premium from Wisent, St-Bruno, QC, Canada), 1% sodium pyruvate, 10 mM Hepes, penicillin (PEN, 50 U/ml)-streptomycin (STREP, 50 µg/ml) (Hyclone Laboratories) and D-

glucose (Sigma-Aldrich) at a final concentration of 4.5 g/l. The Caco-2 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose (4.5 g/l) (Hyclone Laboratories) supplemented with 10% FBS (Wisent), 1% nonessential amino acids and PEN (50 U/ml)- STREP (50 µg/ml) (Hyclone Laboratories). Cells were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. The culture medium was changed every two days until cells reached approximately 70-80% confluency. Cultures were harvested using 0.25% trypsin-0.53 mM EDTA solution (Hyclone Laboratories) and were seeded in 75 cm² flasks (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA) at approximately 5.0×10^4 and 3.5×10^3 cells/cm² for NCI-N87 and Caco-2, respectively.

NCI-N87 and Caco-2 cell monolayers were prepared as described previously (Hubatsch, Ragnarsson et Artursson, 2007 ; Lemieux *et al.*, 2011) with slight modifications. Briefly, cells were seeded onto translucent polyethylene terephthalate (PET) ThinCert inserts (1.13 cm² growth area, 0.4 µm pores, 10⁸ pores/cm², Greiner bio-one, Monroe, NC, USA) at densities of 2.5×10^5 and 3.5×10^4 cells/cm² for NCI-N87 and Caco-2, respectively. The culture medium (0.6 ml in the ThinCert insert and 1.5 ml in the well) was replaced every two days. The NCI-N87 and Caco-2 monolayers were respectively used between 24 to 33 and 21 to 29 days post seeding. Prior the experimentations, integrity of cell monolayers was verified by measuring at 37 °C their transepithelial electrical resistance (TEER, Ω·cm²) using a Millicel ERS-2 Voltohmmeter (Millipore, Bedford, MA, USA). The raw values were corrected by subtracting the intrinsic electrical resistance (ohm, Ω) of the porous support and buffer medium and were then multiplied by the insert surface area (cm²). The NCI-N87 and Caco-2 monolayers grown on permeable supports displaying resistance values over 400 and 250 Ω·cm², respectively, were used during this study.

8.2.5.8 In vitro interactions with epithelial barrier models

8.2.5.8.1 Effect of the CMS microspheres on cell monolayers TEER

The effects of CMS-MS on the NCI-N87 and Caco-2 TEER were studied using post-confluency cell monolayers grown on porous inserts. Cell monolayers were incubated in HBSS pH 7.4 at 37 °C for 1 hour in a rotating orbital shaking incubator at 100 rpm (ROSI

500, Thermolyne, Dubuque, IA, USA). The initial TEER values of the cell monolayers, measured as described in section 2.11, were determined during this incubation period. Then, the apical (AP) transport medium was replaced by freshly prepared PL-CMS-MS suspension at 1 mg/ml or control CD at 1 µg/ml in pH 7.4 HBSS buffer (T 0) and cells returned into the shaking incubator at 37 °C for 3 h. Finally, cell monolayers were washed five times with HBSS pH 7.4 and incubated with NCI-N87 or Caco-2 culture media into a growth incubator. The respective culture media were replaced 24 h post-treatment. The TEER were measured periodically during pre-incubation (initial values), after 3 h treatment, and up to 36 h post-treatment. Results are expressed as % of initial TEER values.

8.2.5.8.2 Cytotoxicity of CMS microspheres

The NCI-N87 and Caco-2 cells were respectively seeded on 96 well plates at density of about 2.5×10^5 and 3.5×10^4 cells/cm² and maintained until 14 days post-confluence. The culture media were replaced by 200 µl of freshly prepared PL- or FU-CMS-MS suspensions at 10 mg/ml in pH 7.4 HBSS. The cells were then maintained 3 h, at 37 °C, in the rotating orbital shaking incubator (100 rpm). Cells were finally washed five times with the HBSS pH 7.4 buffer and their viability was determined using the toxicology assay kit TOX2 (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. Cells treated with only HBSS pH 7.4 were considered as 100% viability (control), and cells treated with HBSS pH 7.4 containing 2% sodium dodecyl sulfate were the 0% viability control. Free FU (0.5 mg/ml) in HBSS pH 7.4 was also used as control against drug loaded microspheres.

8.2.5.9 Drug transport across cell monolayers

The influence of CMS-MS on AP to basolateral (BL) apparent permeability coefficients (P_{app}) of FU across NCI-N87 and Caco-2 monolayers was evaluated under different pH gradients (Hubatsch, Ragnarsson et Artursson, 2007 ; Lemieux *et al.*, 2011) obtained by using HBSS buffered either with 1 mM HCl (pH 3.0) or 20 mM acetate (pH 5.0) as AP transport media for the NCI-N87 monolayers. The HBSS buffered with 25 mM Hepes (pH 7.4) was used as Caco-2 monolayers AP transport medium as well as for all BL transport media. Under all pH evaluated, cell monolayers were incubated for one hour in the orbital

shaking incubator (100 rpm, 37 °C). Then, the transport media were replaced in both compartments by freshly prepared transport media containing CMS microspheres (1 mg/ml) suspension or free FU solution at 0.05 mg/ml on the AP side and drug-free transport medium on the BL side. Dimethyl sulfoxide (0.5% v/v) of was added to the transport media to increase the solubility of furosemide in acidic conditions (Obata *et al.*, 2004). Cell monolayers were placed back in the orbital shaking incubator and sample aliquots were taken periodically from BL compartment over 2 h and replaced by fresh HBSS buffer. The P_{app} (cm/s) of the drug model was calculated according to the equation:

$$P_{app,AP-BL} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \left(\frac{1}{AC_0} \right) \quad (8.3)$$

where dQ/dt is the steady-state flux ($\mu\text{mol/s}$), A is the surface area of the monolayer (cm^2) and C_0 is the initial concentration in the donor (AP) compartment (mM).

FU was quantified by HPLC as described in section 8.2.5.3. The monolayer integrity was evaluated by measuring the TEER before and after the transport events and was also monitored using the integrity marker Lucifer-Yellow (Hubatsch, Ragnarsson et Artursson, 2007 ; Lemieux *et al.*, 2011). Monolayer integrity was appraised with a P_{app} value lower than 1.5×10^{-6} cm/s.

8.2.5.10 Mucoadhesion of CMS microspheres

The CMS-MS mucoadhesion properties were assessed using dynamic assays (Han *et al.*, 1999 ; Perioli *et al.*, 2004a) adapted for the microspheres. Freshly excised porcine stomachs and small intestines were provided by LAB Research (Laval, QC, Canada). The organs were cut longitudinally and carefully washed with aqueous saline solution (NaCl 0.9%). Sections of gastric and intestinal mucosa (about 7 cm^2) were mounted to cover entirely internal bottom surface of a glass vial coated with cyanoacrylate glue and covered with 15 ml of HBSS pH 1.0 and 7.4 for respective mucosa. Then, 15 mg of CMS-MS were added in the glass vial and left to settle for 15 min at 37 °C. The glass vial was then transferred in a shaking incubator (Series 25D New Brunswick scientific, Enfield, CT, USA) at 300 rpm and aliquots were taken periodically over 5 and replaced by fresh HBSS buffer. The CMS-MS concentration in

the samples was determined by drying the sample in an oven at 60 °C until a constant mass was obtained. The values were corrected using background curves (n=3) obtained under the same conditions but without adding microspheres into the glass vial. The % of microspheres still adhered to the mucosa (% of mucoadhesion) was determined by mass balance:

$$\% \text{ of mucoadhesion} = \left(1 - \frac{\text{Concentration of microspheres in samples}}{\text{Concentration}_{\text{max}} \text{ of microspheres in HBSS}} \right) \times 100 \quad (8.4)$$

8.2.5.11 Statistical analysis

Results are expressed as the means \pm SD for “n” independent studies realized with different CMS-MS preparation and “m” replicates per study. Statistical analysis was performed by ANOVA with Tukey-Kramer multiple comparison tests (significance level of $P < 0.05$) using Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

8.2.6 Results and Discussion

8.2.6.1 Drug loading efficiency

The FU loading efficiency into the CMS-MS was about 50% (Figure 8.2B), slightly but statistically higher than for HAS-0. The moderate loading efficiency was most probably due to FU degradation under the basic conditions prevailing during the emulsion cross-linking or to removal from the CMS-MS during the washing step with IPA. Further, this also may explain the slight variability in drug loading obtained at various DS.

8.2.6.2 CMS-MS physicochemical properties

8.2.6.2.1 Microspheres morphology and particle size distribution

CMS-MS retained their shape from the CMS droplets in the emulsion cross-linking with STMP as result of intra- and interchains phosphate bonds which stabilized and strengthened the microspheres. The spherical microspheres presented generally smooth surfaces as showed by SEM micrographs (Figure 8.2A). At high DS of 1.5, microspheres presented indentation with an apparent shrinkage of the microspheres. The placebo (PL-) and drug loaded microspheres (FU-CMS-MS) had no apparent morphological dissimilarity. Placebo and drug

loaded microspheres had a mean diameter $D_{[3,2]}$ of approximately 90 μm with a narrow particle size distribution between 45 and 150 μm and a sphericity factor (Ψ) of approximately 0.9. These characteristics did not show significant differences between the CMS-MS at various DS (Tableau 8.1). The morphology, particles size and size distribution of the CMS-MS were controlled by the emulsion cross-linking process parameters more particularly by the surfactant concentration (Span 80) and stirring rate (Malafaya, Stappers et Reis, 2006) rather than DS.

8.2.6.2.2 Microspheres density measurements

The preparation process also governed the cross linked CMS-MS density. A value of about 1.5 g/cm^3 was measured for placebo and drug loaded CMS-MS produced with DS ranging from 0.1 to 1, and for HAS-0, (Figure 8.2C). Similar values for various DS resulted from the similar mass of polymer solubilised into the emulsion aqueous phase despite the increased molecular weight of the CMS-P with DS (i.e., 162 g/mol for HAS-0 to 246 g/mol for DS 1.5) and of polarity. CMS-MS with a DS of 1.5 had a statistically higher ρ value that could result from the shrinkage of the microspheres observed in Figure 8.2A.

8.2.6.2.3 Water content and equilibrium water uptake

The DS of the CMS had a significant effect on water content and equilibrium water uptake of the placebo and drug loaded microspheres (Figure 8.2 D and E). Increased DS led to higher water content of the CMS-MS (Figure 8.2D), significantly higher at DS 1.0 and 1.5. This could be explained by the increased amount of hydrophilic carboxyl groups on the starch chains with high DS. However, the water content of the CMS-MS remained lower than CMS-P typical value of 10-12% w/w (Lemieux, Gosselin et Mateescu, 2010) probably due to dehydration during washing step or cross-linking of the polymer chains.

Cross-linking of the polymer chains also played a role into the equilibrium water uptake and preserving the swollen CMS-MS structure. For HAS-0-MS, the equilibrium water uptake values obtained in pH 1.0 and 7.4 HBSS buffers (Figure 8.2E) were similar ranging from 11.5 to 17 (slightly lower at pH 1.0 but not statistically different) fitting well the low anionicity of phosphate cross-linking bonds of HAS-0-MS. For CMS-MS, their anionic

character increased with DS, and thus higher equilibrium water uptake in both buffered media. The highest water uptake of approximately 27 and 74 w/w were obtained with CMS-MS (DS 1.5) in pH 1.0 and 7.4 HBSS buffers, respectively. A minimal DS value (above 0.1), was necessary for a significant water uptake difference versus HAS-0-MS. The DS also influenced the pH sensitivity of the CMS-MS. Indeed, the equilibrium water uptake of CMS-MS (DS 0.1) in HBSS pH 7.4 was 1.8 fold higher than in HBSS pH 1.0 whereas for CMS-MS (DS 1.5), the equilibrium water uptake in HBSS pH 7.4 raised to 2.7 fold higher than at HBSS pH 1.0. For HAS-0-MS, this difference between the two media was lower (a factor of 1.5). In HBSS pH 1.0, the equilibrium water uptake was a balance between the higher hydrophilicity of the CMS chains with increasing DS, enhancing the water uptake, and the stronger physical association (H-bonding) between hydroxyl groups, hydroxyl and carboxylic groups and between carboxylic groups of the CMS chains limiting the water uptake and the swelling of the CMS-MS. Differently, at HBSS pH 7.4 the higher hydrophilicity of the CMS chains with increasing DS was associated with repulsive forces between carboxylate anionic groups enhancing the water uptake and swelling.

The FU loading did not modify the stabilisation at pH 1.0. Thus PL and FU-CMS-MS, irrespectively to DS, had very similar equilibrium water uptake values at this pH. At HBSS pH 7.4, the FU-CMS-MS had a slightly higher equilibrium water uptake than that of PL-CMS-MS. The presence of a carboxyl and a sulfonamide groups (Mota *et al.*, 2009) negatively charged on the solubilized FU at pH 7.4 probably enhanced the effect of the repulsive forces on the equilibrium water uptake of the microspheres. Thus, equilibrium water uptake of the CMS-MS will probably be affected by the different conditions prevailing along the GIT.

8.2.6.3 Structural and thermal properties

The properties of starch derivatives, including the control of drug release can be correlated with their crystalline structure (Dumoulin *et al.*, 1998). Figure 8.3 presents the X-ray diffractograms and DSC thermograms of raw materials, PL-HAS-0-MS as well PL and FU-CMS-MS at representative DS.

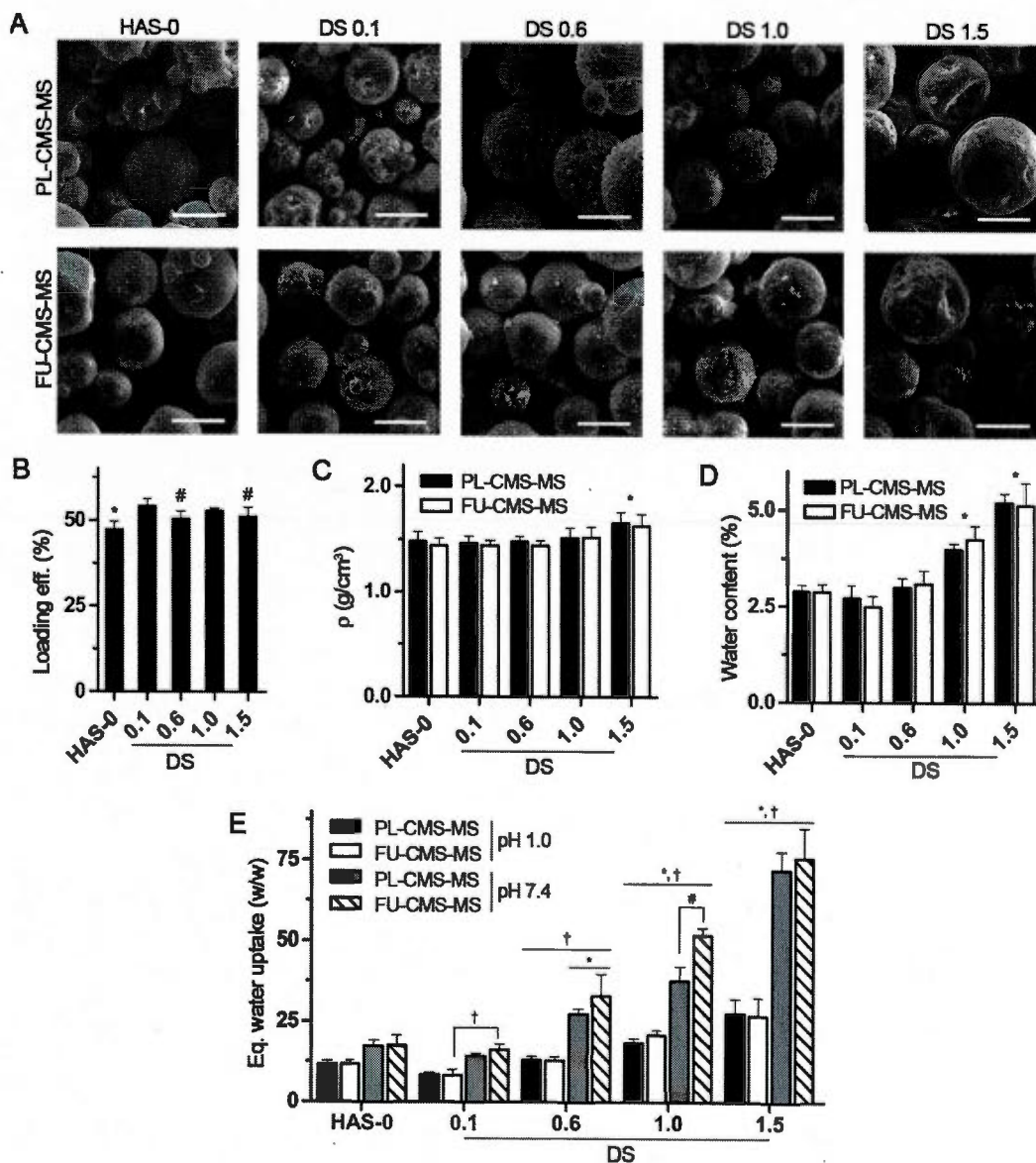


Figure 8.2 Physicochemical properties of placebo (PL) and furosemide (FU) loaded carboxymethyl starch microspheres (CMS-MS) with various degrees of substitution (DS). (A) Scanning electron micrographs of PL- and FU-CMS-MS at a voltage of 20.0 kV and a magnification of 500X; scale bar 50 μm . (B) Apparent density (ρ , g/cm³) (n=3, m=3) *Statistically significant differences within DS group ($p < 0.05$). (C) Drug loading efficiency (%) (n=3, m=3). Statistically significant differences * with CMS and # with CMS-MS DS 0.1 ($p < 0.05$). (D) Water content (%) (n=3, m=3) *Statistically significant differences within DS group ($p < 0.01$). (E) Equilibrium water uptake of PL- and FU-CMS-MS in Hank's balanced salt solution (HBSS) buffered either with 100 mM HCl (pH 1.0) or 25 mM Hepes (pH 7.4) (n=2, m=3). *Statistically significant differences within * DS group ($p < 0.05$), † pH group ($p < 0.05$) and # PL vs. FU group ($p < 0.001$). Results are means \pm SD.

Tableau 8.1 Mean diameter ($D_{[3,2]}$), cumulative size distribution (D_{10} , D_{50} and D_{90}) and sphericity (Ψ) of placebo (PL) and furosemide loaded (FU) CMS microspheres (CMS-MS) at various degrees of substitution (DS) (n=2, m=3)

CMS-MS		Granulometry (μm)				Ψ
DS	Form	$D_{[3,2]}$	D_{10}	D_{50}	D_{90}	
HAS-0	PL	93.29 \pm 47.17	52.15 \pm 4.70	80.25 \pm 4.90	146.70 \pm 15.33	0.91 \pm 0.09
	FU	90.86 \pm 42.43	51.25 \pm 3.70	79.79 \pm 8.90	143.79 \pm 25.12	0.91 \pm 0.08
0.1	PL	85.48 \pm 35.82	48.04 \pm 1.77	78.30 \pm 2.14	131.90 \pm 10.82	0.91 \pm 0.08
	FU	88.38 \pm 36.05	51.03 \pm 2.62	81.17 \pm 3.17	133.74 \pm 10.15	0.90 \pm 0.07
0.6	PL	89.89 \pm 33.50	50.91 \pm 3.14	85.08 \pm 8.92	134.91 \pm 11.68	0.91 \pm 0.08
	FU	90.39 \pm 33.39	51.91 \pm 4.15	85.85 \pm 5.65	134.02 \pm 10.82	0.90 \pm 0.08
1.0	PL	91.29 \pm 37.50	48.78 \pm 3.48	84.94 \pm 10.67	142.59 \pm 14.52	0.91 \pm 0.07
	FU	91.25 \pm 42.45	46.65 \pm 4.45	85.21 \pm 6.78	146.68 \pm 7.65	0.89 \pm 0.09
1.5	PL	92.44 \pm 40.21	49.01 \pm 2.13	83.57 \pm 6.07	149.26 \pm 9.38	0.92 \pm 0.07
	FU	89.31 \pm 37.46	47.78 \pm 2.29	82.04 \pm 8.29	141.90 \pm 12.49	0.92 \pm 0.08

8.2.6.3.1 X-ray crystallography

The X-ray diffraction patterns of Hylon VII (native starch), CMS-P and PL-HAS-0-MS are characterized by minor but well defined diffraction peaks superposed on a large amorphous background corresponding to semi-crystalline polymers (Figure 8.3A). The influences of the cross-linking and of the DS on the crystalline structure of Hylon VII were previously investigated (Dumoulin *et al.*, 1998 ; Ispas-Szabo *et al.*, 1999 ; Lemieux, Gosselin et Mateescu, 2010). These studies showed that increased cross-linking or DS induces a shift from the "B-type structure" (double helix) of native starch to a predominant "V-type structure" (single helix) and to more amorphous conformation, as showed here for CMS-P or PL-HAS-0-MS. For PL-CMS-MS, the additional effect of cross-linking and DS resulted to an almost flat X-ray pattern corresponding to an amorphous material. The cross-linking and the presence of the carboxymethyl groups, physically and through steric hindrance respectively, impaired the formation of the double and single helix, modifying ultimately the hydrogen bonding of the starch chains backbone to an amorphous conformation. The Fu loading into the CMS-MS did not modify the X-ray diffraction pattern. FU-CMS-MS remained mostly

amorphous with no peaks assigned to the crystalline diffraction pattern of pure FU. The small peak at about 32° on the X-ray diffractograms of PL-HAS-0-MS, PL- and FU-CMS-MS are probably due to impurities inside the microspheres.

8.2.6.3.2 Differential scanning calorimetry (DSC)

The DSC thermograms of the different samples corresponded to their respective crystalline structures. Figure 8.3A B shows a significant exothermic event at 215 °C for crystalline FU corresponding to the melting point with decomposition (Aceves, Cruz et Hernandez, 2000) whereas the endothermic DSC events for the semi-crystalline Hylon VII and CMS-P at 170 °C resulted from the melting of the polymer. The DSC thermogram of the PL-HAS-0-MS showed a smaller melting peak at 146 °C which can be related to the "V-type structure" shown by X-ray diffraction pattern (Figure 8.3A A). Amorphous CMS-MS presented no marked thermal events. However the CMS-MS thermograms between 50 and 150 °C (Figure 8.3A B inset) revealed two consecutive small decreases in heat capacity with the midpoints of the first and the second heat capacity decrease at 85 ± 3 and 135 ± 5 °C respectively, reasonably resulted from the removal of residual solvents, IPA and water, respectively entrapped into the microsphere polymeric structure. These results showed that the production of CMS-MS by emulsion cross-linking of CMS-P with different DS resulted into amorphous materials where the FU was uniformly dispersed in the microspheres and suggesting a good compatibility between FU and the CMS.

8.2.6.4 *In vitro* drug release properties

Figure 8.4 presents dissolution profiles obtained for FU-CMS-MS in (A) pH 1.0 and (B) pH 7.4 HBSS buffers until complete release the model drug FU. Figure 8.4A also presents the dissolution profile of free FU and 90% drug release time ($T_{90\%}$, inset) of FU from CMS-MS. In pH 1.0 HBSS, with DS increase, the drug release rate decelerated leading to significantly higher $T_{90\%}$ for DS 1.0 and 1.5 (up to 1 hour). The slower FU release with increasing DS in HBSS pH 1.0 can be ascribed to a lower swelling of the microspheres induced by a higher hydrogen association between the polymer chains with DS, as described in section 3.2.3, and to higher interactions of FU with the associative forces network inside the microspheres.

Indeed, under acidic conditions (below pKa) the carboxyl and sulfonamide groups of FU are protonated allowing them to form hydrogen bonding with hydroxyl or carboxylic groups of CMS-MS. The cross-linking of the CMS chains appeared to modify the influence of the DS on the drug release properties of CMS based dosage forms. It was previously shown that for CMS-P monolithic tablets loaded with acetaminophen, $T_{90\%}$ increased with DS up to 1.2 and that further DS increase to 1.7, significantly decreased the $T_{90\%}$ due to higher polymer solubility in acidic conditions (Lemieux, Gosselin et Mateescu, 2009). The cross-linking in CMS-MS reduced the solubility of the polymer and allowed higher interactions between the polymer chains by restraining the microspheres swelling. Figure 8.4A also shows that the FU loading into the CMS-MS, irrespectively to DS, increased the FU solubility in pH 1.0 HBSS buffer to ≈ 28 compared to ≈ 6 $\mu\text{g/ml}$ for free FU control allowing the almost complete FU release within 2 h. The higher FU solubility in acidic medium when associated to CMS-MS was probably due, at least in part, to its amorphous form into the microspheres (Figure 8.3). Indeed, amorphous pharmaceuticals are markedly more soluble than their crystalline counterparts (Hancock et Parks, 2000).

In HBSS buffer pH 7.4, the high swelling of the CMS-MS resulting from the fast acting repulsive forces between the hydrophilic polymer chains associated with the significantly higher solubility of FU induced an immediate FU release, in less than 0.08 h, into the dissolution medium regardless of the DS (Figure 8.4B). These results indicate that CMS-MS might be used as gastroretentive dosage form for the controlled drug release into the stomach or as enteric dosage form for the fast drug release localized into the upper small intestine.

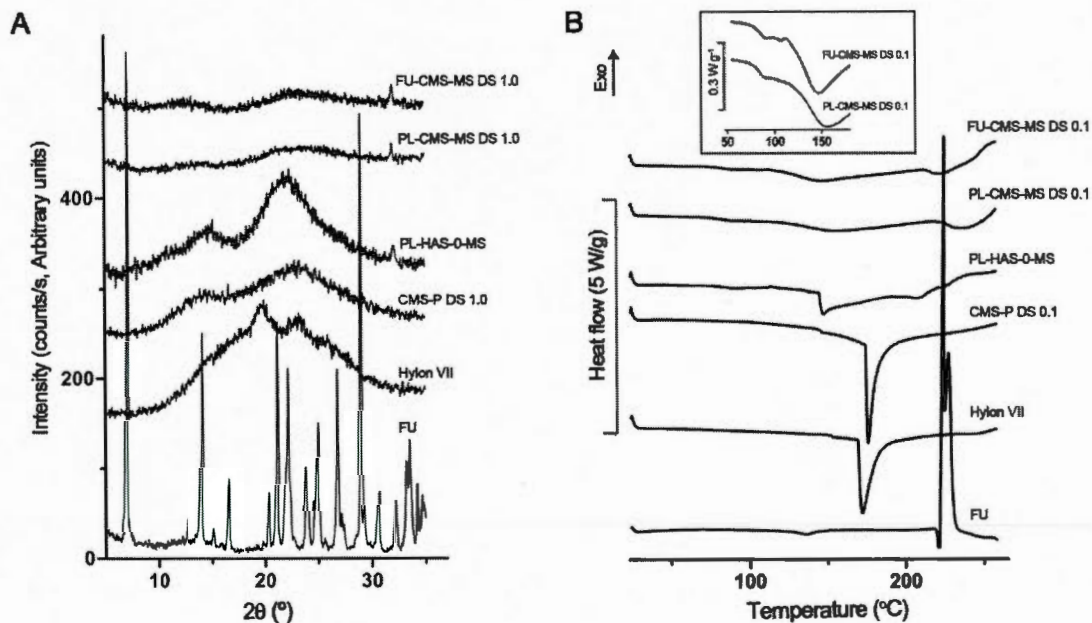


Figure 8.3 Carboxymethyl starch microspheres (CMS-MS) structure. X-ray diffractograms (A) and DSC thermograms (B) of furosemide (FU), hylon VII (HYVII), CMS powder (CMS-P), placebo (PL) and furosemide (FU) loaded CMS-MS with CMS at representative degree of substitution (DS), Inset in (B) PL- and FU-CMS DSC thermograms zoom between 50 and 175 °C.

8.2.6.5 *In vitro* interactions with epithelial barrier models

The intimate contact of the mucoadhesive microspheres with GIT mucous membranes could hypothetically provoke perturbations to the epithelial barrier including tight junction structural separation, and as hypothetical extreme adverse effect, activation of the death pathways of the cells after the contact with the microspheres.

8.2.6.5.1 Effect of the CMS microspheres on cell monolayers TEER

The influence of PL-CMS-MS on the tight junction dynamic (barrier function) of the epithelial barrier models, NCI-N87 (gastric) and Caco-2 (intestinal) cell monolayers was evaluated by quantifying the TEER time course (relative to initial value) of the cell monolayers exposed to the microspheres at a concentration of 1 mg/ml in HBSS pH 7.4 (Figure 8.5 A and C). For NCI-N87 monolayers (Figure 8.5A), during the treatment, the presence of CMS-MS at their surface did not modify the monolayers TEER in opposition to

treatment with 1 $\mu\text{g/ml}$ of CD, an actin-disrupting control agent for tight junction opening (Stevenson et Begg, 1994), gradually reducing the monolayer TEER to a minimal value of 54%. The NCI-N87 monolayers treated with CMS-MS showed higher TEER variability with no significant TEER loss during the two days post-treatment monitoring. The initial average TEER values were 535 ± 77 and $313 \pm 30 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (SD) respectively for NCI-N87 and Caco-2 monolayers. For Caco-2 monolayers (Figure 8.5C), the presence of the microspheres at their surface lead to a significant reduction of the TEER after the 3 h treatment (%TEER, 3h) compared to HBSS pH 7.4 exposure. TEER were significantly lower for CMS-MS(DS 1.0 and 1.5) compared to treatments with HAS-0-MS or CMS-MS(DS 0.1) microspheres. As for the NCI-N87 monolayers, the treatment with CD control induced the most important but reversible TEER decrease with an almost complete TEER recovery within 12 h post-treatment. Almost complete TEER recovery was also observed within 12 h post-treatment for a cell monolayers treatment with PL-CMS-MS and was maintained during the two days post-treatment monitoring.

The different effect of the CMS-MS on the monolayers TEER of the two epithelial models can be explained by a fundamental phenotype difference between the two cell lines grown post-confluency on porous inserts. The NCI-N87 are mucoplectic cells producing gastric mucin-6 (Basque *et al.*, 2001) and evenly distributing large mucus clusters over the AP side of the monolayer (Lemieux *et al.*, 2011) differing thus to Caco-2 cells, largely used by pharmaceutical industry for in vitro prediction of intestinal drug permeability and absorption (Hubatsch, Ragnarsson et Artursson, 2007). The presence of the mucus cluster at the surface of the NCI-N87 monolayers can protect the monolayer tight junctions from the action of CMS-MS allowing to maintain their initial barrier function. Disarrangement of the mucus cluster post-treatment, due to the removal of microspheres and/or the associated intensive washing, could explain the high TEER variability showed by the NCI-N87 monolayers(Figure 8.5A). The specific mechanism of action of the CMS-MS on the tight junction opening of the Caco-2 monolayers (Figure 8.5C) is unknown but could be at least in part owed to the water uptake and subsequent swelling of the microspheres causing dehydration of the epithelial cells and alterations of tight junctions (Björk *et al.*, 1995). The marked TEER decrease with the CMS-MS at higher DS might be due to higher interactions

between negatively charged carboxylate groups with negatively charged sites of the cells surfaces and tight junctions that would lead to more disbanded perijunctional rings (Harikarnpakdee *et al.*, 2006). Another possibility can be the increased calcium-binding capacity of CMS with high DS (Volkert *et al.*, 2004), that may deplete extracellular Ca^{2+} necessary to maintain the tight junction (Stevenson *et Begg*, 1994). The larger cell monolayers surface coverage of the CMS-MS with high DS resulting from more water uptake at pH 7.4 (Figure 8.2E) could enhance the effect of the CMS-MS on Caco-2 monolayers for these tight junction opening mechanisms. It is expected that the CMS-MS, following their stronger effect on the tight junction of Caco-2 versus NCI-N87 monolayers, will enhance the drug absorption via the paracellular route more across intestinal rather than gastric mucosa.

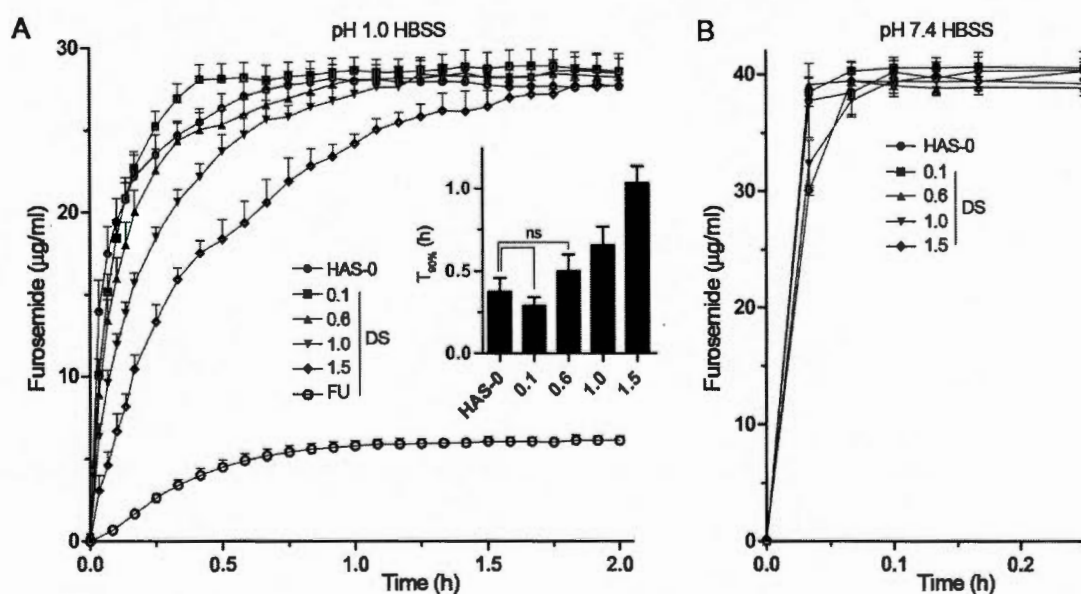


Figure 8.4 Drug release profiles of Furosemide (FU, 20 mg) and FU loaded into CMS-MS (400 mg) with various degrees of substitution (DS) in Hank's balanced salt solution (HBSS) buffered at pH 1.0 with 100 mM HCL 100 mM (A) and at pH 7.4 in HBSS with 25 mM Hepes (B)).) in 500 ml and at 37 °C (means \pm SD of $n=2$, $m=3$). Results are expressed as FU cumulative concentration ($\mu\text{g/ml}$). Inset in (A) presents 90% drug release time ($T_{90\%}$, min). Non-significant differences (ns, $p > 0.05$).

8.2.6.5.2 Cytotoxicity of CMS microspheres

The cellular viability study of NCI-N87 and Caco-2 cells exposed to CMS-MS in HBSS pH 7.4 buffer for a period of 3 h shows that at 10 mg/ml, irrespective to the DS and FU loading, the microspheres did not induce any cell mortality since their measured activity level was almost identical to that of HBSS pH 7.4 (control) (Figure 8.5 B and D). The FU control also did not induce any cell mortality. Differently, the SDS control led to significant cells mortality. This confirmed that the Caco-2 TEER decrease induced by the microspheres (Figure 8.5C) did not result from the death or integrity impairment of cells composing the monolayers but more from tight junctions opening. These results showing no toxicity for the CMS-MS predict a safe human use.

8.2.6.6 Drug transport across cell monolayers

Factors limiting oral drug absorption are typically slow and/or incomplete dissolution, formation of insoluble complexes and/or decomposition in the gastrointestinal lumen, poor net permeability and first-pass metabolism (Dressman, Thelen et Jantravid, 2008). For drugs with low permeability (BCS classes III or IV), their transport across GIT epithelial barriers can affect their overall absorption. Thus, their formulation with an adequate delivery system can enhance their permeation in a specific region. Figure 8.6 presents the P_{app} fold increase of FU transported from CMS-MS in comparison to the P_{app} of free FU across NCI-N87 monolayer with pH gradients of 3.0_{AP}-7.4_{BL} and 5.0_{AP}-7.4_{BL} (Figure 8.6 A and B) and across Caco-2 monolayer under an isocratic conditions (AP and BL at pH of 7.4) (Figure 8.6C). The P_{app} values of free FU across NCI-N87 monolayers were relatively poor at 1.13×10^{-5} and 4.08×10^{-6} cm/s, respectively, for pH gradients of 3.0_{AP}-7.4_{BL} and 5.0_{AP}-7.4_{BL}, but significantly higher than Caco-2 values of 4.57×10^{-7} cm/s in isocratic conditions of AP-BL pH of 7.4. The higher free FU P_{app} values obtained across the NCI-N87 monolayers were due to the diminution of the monolayer TEER under acidic pH gradients (about 40 and 90% of initial value for AP pH 3.0 and 5.0 respectively), and to the higher concentration of non ionized form of FU at lower pH that can diffuse through biological membranes (the “pH-partition hypothesis”) (Lemieux *et al.*, 2011). The initial average TEER for NCI-N87 cells monolayers at AP pH of 3.0 and 5.0 were respectively of 498 ± 79 and 494 ± 71 and for Caco-2 at AP pH of 7.4 was of $327 \pm 43 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (SD).

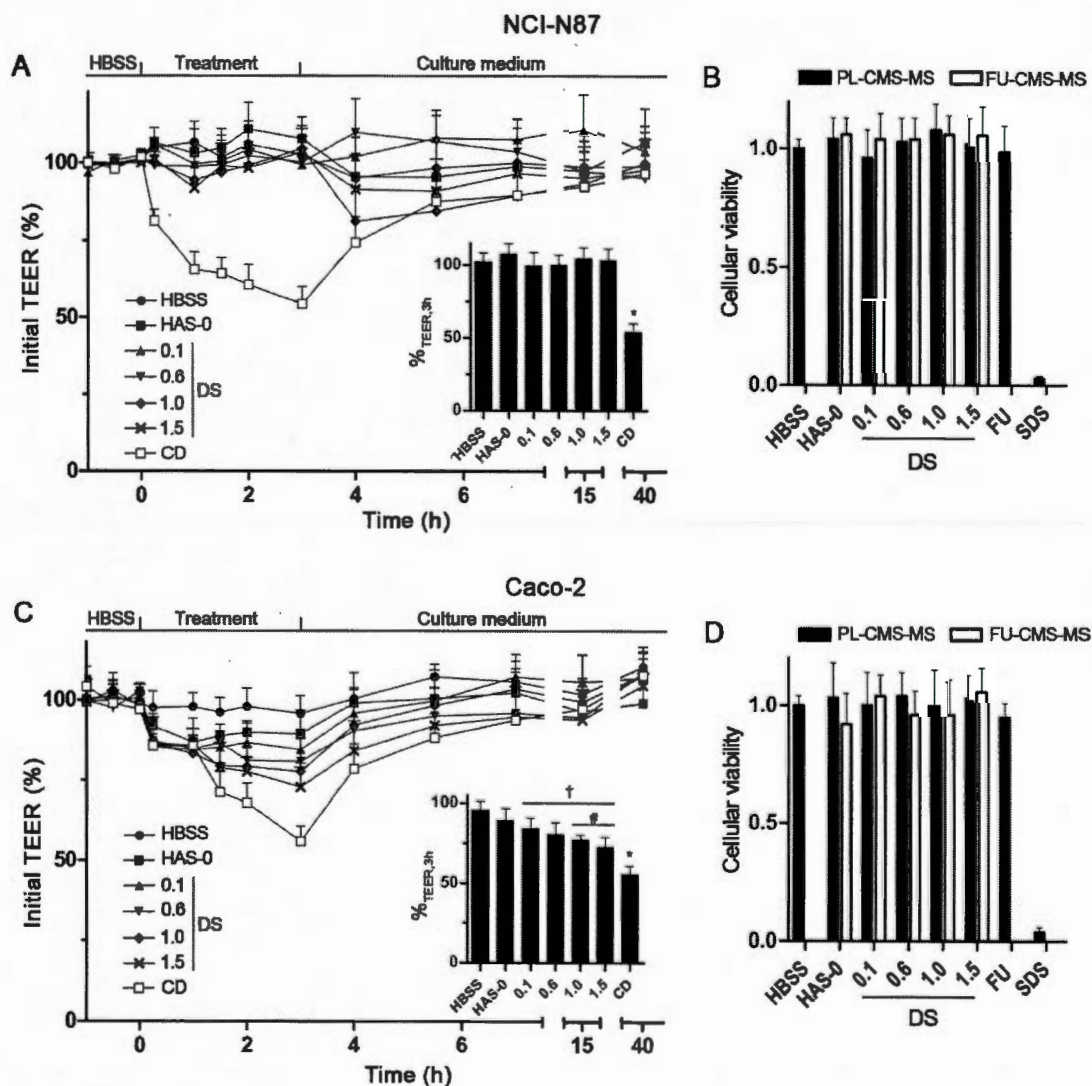


Figure 8.5 Interaction of carboxymethyl starch microspheres (CMS-MS) at various degrees of substitution (DS) with gastric (NCI-N87) and intestinal (Caco-2) epithelial barrier models. Influence of placebo (PL) CMS-MS (1 mg/ml) and CD (1 μ g/ml) on transepithelial electrical resistance (TEER) of (A) NCI-N87 and (C) Caco-2 monolayers expressed as % of initial TEER value in Hank's balanced salt solution (HBSS) buffered at pH 7.4 ($n=2$, $m=3$). Inset in (A) and (C) presents % of initial TEER after 3 h treatment ($\%_{TEER,3h}$) with CMS-MS or controls (Statistically significant differences with * other treatments, # with DS 0.1 and † HBSS pH 7.4, $p < 0.05$). Cellular viabilities of (B) NCI-N87 and (D) Caco-2 cells exposed 3 h to PL and furosemide (FU) loaded CMS-MS (10 mg/ml), sodium dodecyl sulfate (SDS) and free FU (0.5 mg/ml) expressed as fraction of cells treated with pH 7.4 HBSS buffer ($n=3$, $m=4$). Results are means \pm SD.

Across the NCI-N87 monolayers with a pH gradient of 3.0_{AP}-7.4_{BL} (Figure 8.6A), the P_{app} of the FU liberated from the CMS-MS(DS 0.1) was not significantly higher than the free FU P_{app} . For CMS-MS(DS 0.6), P_{app} increased significantly by about 1.5 fold but no further increase was observed at higher DS. At a pH gradient of 5.0_{AP}-7.4_{BL} (Figure 8.6B), the FU P_{app} with HAS-0-MS increased significantly by about 1.5 fold versus free FU and slightly continued to increase up to 1.75 fold at DS of 0.6. Further DS increase to 1.0 and 1.5 led to a slight decrease of FU P_{app} . The increase of the FU P_{app} induced by the CMS-MS under *in vitro* simulated gastric conditions was relatively low compared to initial P_{app} free FU values and to the fact that CMS-MS did not induce monolayer tight junctions opening (Figure 8.5A). Also, the moderate increase of FU P_{app} across the NCI-N87 monolayers induced by the CMS-MS could be ascribed to a local increase in the drug concentration at the surface, in the transport medium or into the mucus clusters of the cell monolayers resulted from the contact with the microspheres. The increased drug concentration inside the mucus clusters at the surface of the NCI-N87 monolayers was supported by the fact that the FU mass balance, determined following Hubatsch *et al.* (2007), was lower to about 70-75% for the transport assays involving the microspheres compared to the transport assays with free FU(80-85%). The influence of the DS on the modulation of the FU P_{app} appeared to be moderate and pH dependant (Figure 8.6 A and B). The slightly higher FU P_{app} found with CMS at increasing DS could be due to perturbation induced by interactive attractive or repulsive forces between the carboxylic or carboxylate groups on the polymer chains modifying the transport properties across the gastric epithelial barrier.

The FU transport across the Caco-2 monolayer in isocratic conditions of AP and BL pH 7.4 led to a marked FU P_{app} increase with the DS of CMS-MS from about 2.8 fold for HAS-0-MS to 9.1 fold for CMS-MS with increased DS up to 1.5 compared to free FU P_{app} (Figure 8.6C). The higher FU $P_{app, AP-BL}$ induced by the microspheres probably resulted from an increased paracellular FU transport across the epithelial barrier associated with the monolayer tight junctions opening (Figure 8.5C) and a local increase in the drug concentration in the transport medium directly at the surface of the cell monolayers. The higher swelling of the CMS-MS with increasing DS could also contribute to the higher FU $P_{app, AP-BL}$ by increasing the surface contact area between the microspheres and the Caco-2 monolayers. FU mass balances at the end of the transport assays across the Caco-2 monolayers were over 85%.

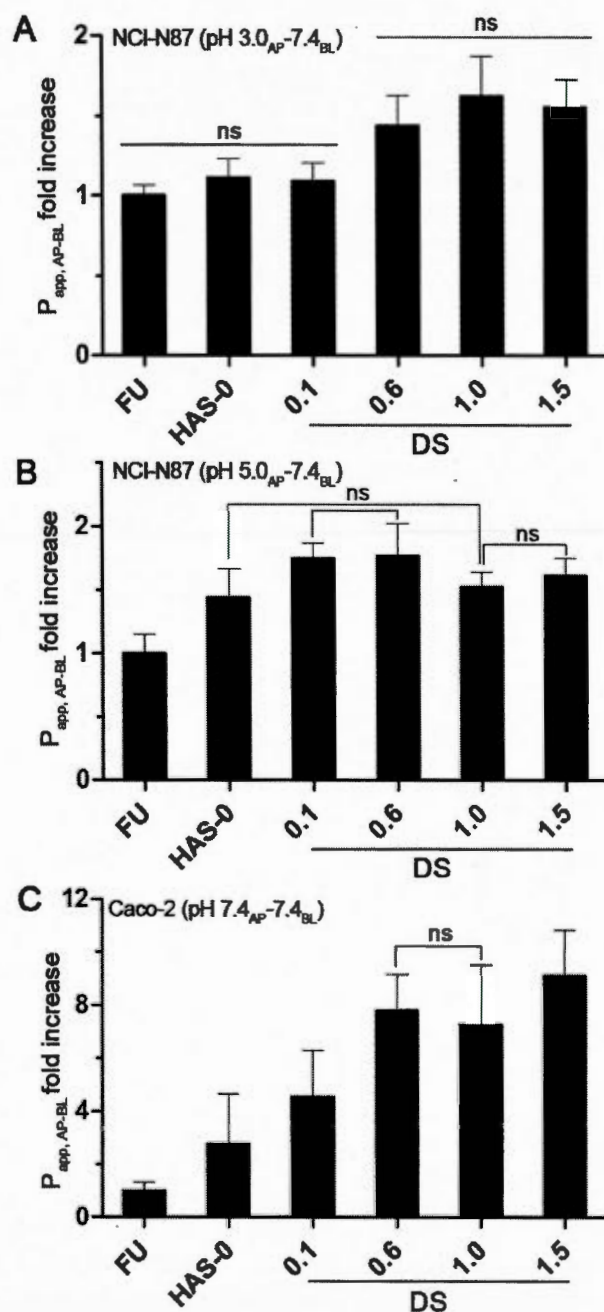


Figure 8.6 Furosemide (FU) transport across gastric (NCI-N87) and intestinal (Caco-2) epithelial barrier models exposed to carboxymethyl starch microspheres (CMS-MS) at various degrees of substitution (DS). Apical (AP) to basolateral (BL) apparent permeability coefficient (P_{app}) fold increase from free furosemide (FU, 0.05 mg/ml) to FU loaded into CMS microspheres (1 mg/ml) across NCI-N87 monolayer with pH gradients of 3.0_{AP} - 7.4_{BL} (A) and 5.0_{AP} - 7.4_{BL} (B) and across Caco-2 monolayer isocratic AP and BL pH of 7.4 (C) (means \pm SD, $n=2$, $m=3$). Non-significant differences (ns, $p > 0.05$).

Overall, these results suggested that (i) the high local concentration of FU at the surface of the gastric epithelial barrier and (ii) intestinal epithelial barrier TEER decrease, both promoted by the CMS-MS, seem beneficial for absorption through the GIT. The higher acidic solubility (Figure 8.4A) of the amorphous FU when loaded into the microspheres (Figure 8.3A) is expected to further increase the bioavailability of FU by enhancing the gastric dissolution, especially for use of CMS-MS in gastroretentive applications.

8.2.6.7 Mucoadhesion of CMS microspheres

Mucoadhesive microspheres prolong the residence time of the model drug at the site of absorption, increasing absorption and bioavailability (Vasir, Tambwekar et Garg, 2003). Under acidic conditions strong hydrogen bonding between mucus and carboxylic functional groups of CMS would be expected, while at higher pH values, repulsion from carboxylate functional groups can alter the conformation of coiled state making them more available for inter-diffusion and interpenetration mucoadhesive mechanisms (Andrews, Lavery et Jones, 2009). This will allow employing CMS-MS as mucoadhesive dosage form for oral drug delivery through the GIT. Irrespectively to DS, mucoadhesion of CMS-MS was much higher in gastric (Figure 8.7A) than under intestinal (Figure 8.7B) conditions. In acidic medium (HBSS pH 1.0), microspheres adhesion decreased to reach a plateau of 25 to 60% for different DS after 2 h. Mucoadhesion plateau values increased significantly from HAS-0-MS up to CMS-MS with a maximal DS value of 1.0. Further DS increase to 1.5 resulted in a considerable decrease of the mucoadhesivity to the minimal HAS-0-MS plateau value. In neutral medium (HBSS pH 7.4), mucoadhesion on the intestinal mucosa continually decreased with DS and time up to 4 h for all HAS-0-MS and CMS-MS. The HAS-0-MS presented the highest mucoadhesivity on the intestinal mucosa of about 20-25%. For a DS of 0.6 and above, CMS-MS mucoadhesion decreased drastically until a 10% and less plateau value after 2 h.

The corroboration of the microspheres mucoadhesion (Figure 8.7) with their water uptake properties (Figure 8.2E) showed an important role of hydration in agreement with the general observation that each polymer has a critical degree of hydration required for optimal mucoadhesion (Ugwoke *et al.*, 2005) allowing mucoadhesive molecules to become free for

surface interpenetration, interlocking, Van der Waals or hydrogen bonding mucoadhesive mechanisms (Andrews, Lavery et Jones, 2009 ; Smart, 2005). The low anionic cross-linked HAS-0-MS had a slightly higher mucoadhesivity on the gastric (Figure 8.7A) than on the intestinal mucosa (Figure 8.7B) related to moderately lower water uptake in HBSS pH 1.0 than in HBSS pH 7.4 (Figure 8.2E). However, the $25\pm5\%$ of mucoadhesion of the HAS-0-MS could be considered poor on GIT mucosa. The lower water uptake under acidic condition of the CMS-MS represents a favorable condition for mucoadhesive CMS-MS particularly for gastric retentive drug formulation. This improved mucoadhesivity can be also related to a higher amount of hydrogen bonding between carboxylic groups and mucus glycoprotein. The major and surprising loss of mucoadhesivity for the DS 1.5 CMS-MS can be explained by dimerization of the abundant carboxylic groups leaving thus fewer active adhesive sites available for mucoadhesion.

In HBSS pH 7.4, the lack of intestinal mucoadhesion of the CMS-MS may be due to the repulsion of the carboxylate groups on the starch by the negatively charged mucin chains. Usually, higher swelling enhances mucoadhesion by interpenetration and adhesion of the polymers to the glycoprotein chains (Andrews, Lavery et Jones, 2009). In the case of CMS-MS, the larger swelling of the microspheres with high DS was increasing in a first step the contact surface between the polymer and the mucus, but may also better expose repulsive forces facilitating in a second step the separation of the microspheres from the intestinal mucosa.

The CMS-MS with DS between 0.6 and 1.0 presented better mucoadhesion on gastric than on the intestinal mucosa with over 55% after 5 h subjected to shear stress. The *in vitro* characterization of the CMS-MS on gastric and intestinal mucosas indicated the CMS-MS as a suitable for gastroretentive only, but not for intestinal mucoadhesion applications.

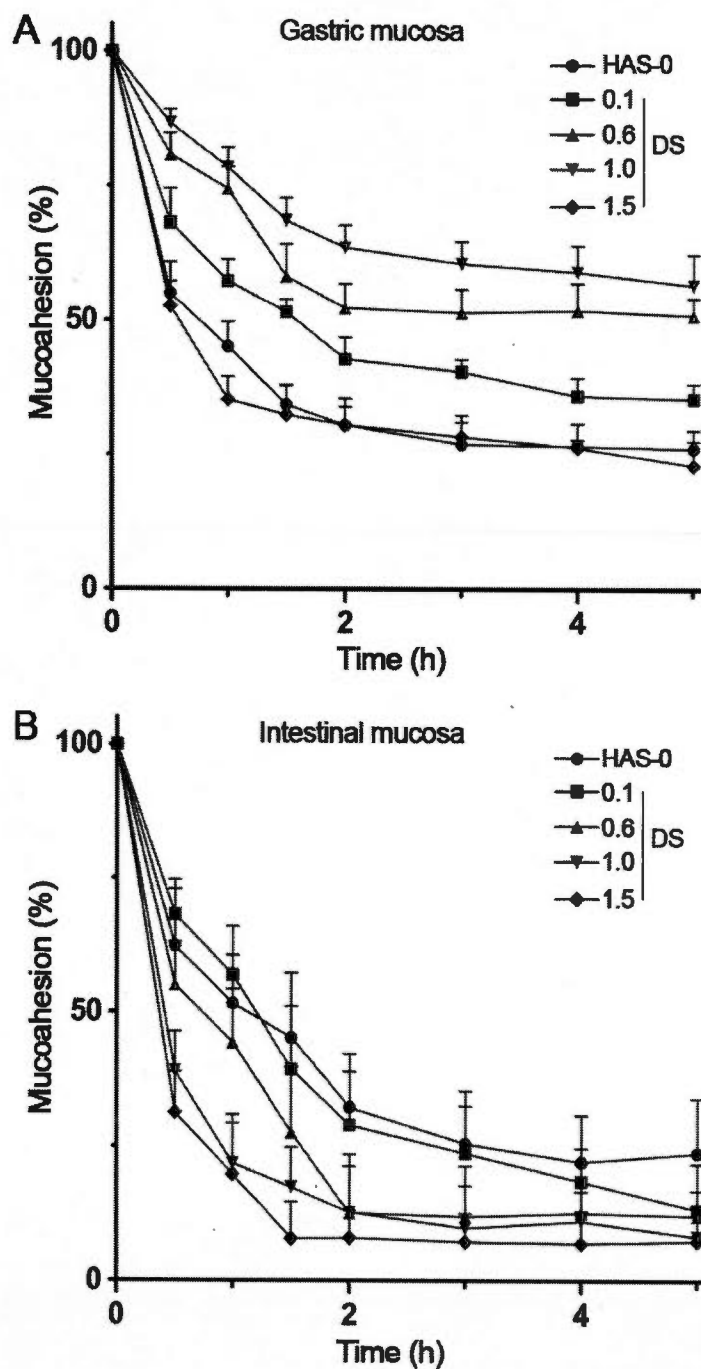


Figure 8.7 Mucoadhesion properties of carboxymethyl starch microspheres (CMS-MS) at different degrees of substitution (DS) under gastric and intestinal conditions as percentage of placebo (PL) CMS-MS still adhered at various times on (A) gastric mucosa in Hank's balanced salt solution (HBSS) buffered with 100 mM HCl (pH 1.0) and (B) intestinal mucosa in HBSS buffered with 25 mM Hepes (pH 7.4) (means \pm SD, $n=3$).

8.2.7 Conclusion

The objective of this study was: i) to develop mucoadhesive microspheres using CMS for the oral delivery of small molecules in GIT (acidic and neutral) simulated conditions and ii) to evaluate their interactions with cell models of the GIT epithelial barriers. The loading of furosemide into the CMS-MS markedly increased (4.6 fold) its solubility at pH 1.0 from 6 to 28 $\mu\text{g/ml}$. At pH 7.4 (HBSS), the water uptake of the microspheres was higher increasing markedly with DS. The NCI-N87 monolayer tight junctions were not modified by the CMS-MS. TEER decrease for the Caco-2 monolayers in contact with the CMS-MS with increasing DS suggested the tight junctions opening enhancing the permeation rate of FU liberated from the CMS-MS up to 9.1 fold at a DS of 1.5 compared to free FU. The permeation rate of FU liberated from the CMS-MS across NCI-N87 monolayers was increased when compared to that of the free FU, but lesser than across Caco-2 cell monolayers. CMS-MS at all DS, up to concentrations of 10 mg/ml, were not cytotoxic for the NCI-N87 or for Caco-2 cells. At the surface of the gastric mucosa under acidic pH, the mucoadhesion of the CMS-MS increased with the DS up to a maximum at 1.0 followed by a marked decrease for DS 1.5. No mucoadhesion was found, irrespective of DS, for CMS-MS on the intestinal mucosa under neutral surrounding pH. This study suggests CMS-MS with a DS between 0.6 and 1.0 as suitable for mucoadhesive gastroretentive dosage forms for the controlled systemic or localized oral delivery of small molecules including those of low solubility.

8.2.8 Acknowledgments

The financial support from NSERC (Natural Science and Engineering Research Council of Canada) Discovery Program and from MITACS-Accelerate program (Canada) in partnership with Corealis Pharma Inc. (Laval, Canada) and FQRNT (Quebec Nature and Technology Research Fund) is gratefully acknowledged. Thanks are due to Mr. Frédéric Bouchard (UQAM), Dr. Fernando Chaurand (LAB research), Mr. Philippe Ducharme (UQAM), Pr. Catherine Jumarie (UQAM), Mr. Bastien Landry (Corealis Pharma) and Pr. Joanne Paquin (UQAM) for support and helpful discussions.

CHAPITRE IX

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'importance actuelle des excipients et la nécessité d'en développer de nouveaux pour permettre l'élaboration de formes pharmaceutiques solides à administration orale performantes et robustes d'un point de vue de l'efficacité thérapeutique ont été soulevées dans l'introduction et, de l'avis de l'auteur de cette thèse, sont des facteurs parfois trop négligés par l'ensemble des intervenants de l'industrie pharmaceutique et des biotechnologies. Dans ce contexte, le CMA a été récemment introduit comme excipient fonctionnel pour le contrôle de la libération des PA. La revue de littérature effectuée au chapitre 3 a montré que seuls les CMA faiblement substitués ($DS < 0,3$) sous leur forme sodique, réticulés ou non, et produits par synthèse aqueuse ont été utilisés pour la production de comprimés monolithiques chargés avec une variété de PA et d'agent bioactifs. Toutefois, ces propriétés, conjointement au fait qu'aucune étude n'avait démontré explicitement la capacité des CMA à moduler la libération des PA en fonction du pH du milieu environnant, limitaient l'essor du CMA comme excipient multifonctionnel de choix pour l'élaboration de formes pharmaceutiques à administration orale et à libération contrôlée.

Dans le but de répondre à cette problématique générale ainsi qu'à des problématiques spécifiques (section 4.1), qui définissaient les hypothèses (section 4.2) et les objectifs spécifiques (section 4.3) de cette recherche, des approches méthodologiques (section 4.5) ont été développées sous le concept de la caractérisation multifactorielle et interdépendante des propriétés structurales, physico-chimiques et fonctionnelles des CMA ainsi que de ses formulations les contenant.

Cette caractérisation des propriétés des CMA a été réalisée selon :

- l'influence des méthodes de séchage et des faibles DS des CMA produits par synthèse aqueuse et formulés sous forme de comprimés monolithiques (chapitre V);
- l'influence de l'augmentation de la valeur du DS et de la forme (sodique ou acide) des CMA produits par réaction diphasique en milieu organique et formulés également sous forme de comprimés monolithiques (chapitres VI);
- l'utilisation des CMA formulés sous forme de microsphères mucoadhésives pour l'élaboration d'un système d'administration gastro-rétentif (chapitre VIII).

Afin de permettre la réalisation de cette dernière caractérisation, un nouvel outil de caractérisation, soit la lignée cellulaire NCI-N87 comme modèle *in vitro* de la barrière épithéliale gastrique pour l'évaluation de la perméabilité gastrique des PA (chapitre VII), a été au préalable développé. Les résultats présentés dans ces différents chapitres constituent le corps de cette thèse et ont permis d'atteindre l'objectif général de ce projet de recherche qui était de poursuivre le développement du CMA comme nouvel excipient pour l'élaboration de formulations pharmaceutiques solides à libération contrôlée administrées par voie orale.

Puisque ces résultats ont déjà fait l'objet d'analyses et de discussions à l'intérieur de leur manuscrit respectif et qu'il demeure quelques problématiques non résolues, la présente discussion a pour but d'effectuer une synthèse et une appréciation de ces résultats afin de mieux définir les propriétés des CMA, les propriétés des formulations à base de CMA, le caractère multifonctionnel des CMA et les limites d'application des CMA. L'utilisation de la lignée NCI-N87 comme outil *in vitro* pour évaluer la perméabilité gastrique des PA sera également discutée. Tout comme les approches méthodologiques, cette discussion s'articulera en fonction de l'interdépendance des influences des caractéristiques des CMA sur ses propriétés ainsi que les propriétés des formulations à base de CMA.

9.1 Influence du degré de substitution, de la structure, de la méthode de synthèse et de la méthode de production des formulations

L'objectif de la carboxyméthylation des amidons est d'obtenir un excipient hydrophile anionique modulant le taux de libération des médicaments en fonction de la variation des valeurs de pH physiologique le long du TGI : sous des conditions acides (gastrique) avec un faible taux de libération et sous des conditions neutres (intestinale), avec un taux de libération élevé. L'hypothèse principale de cette thèse était que la capacité des CMA à moduler les taux de libération des médicaments augmentait avec l'élévation du DS par la modification des forces attractives et répulsives entre les chaînes de CMA. Les profils de dissolution de l'acétaminophène à partir des comprimés monolithiques (figures 5.6, 6.6 et 6.9) et de la furosémide à partir des microsphères (figure 8.4) ont confirmé cette hypothèse, mais ont également démontré que l'influence du DS sur les propriétés de libération des PA dépendait des formes solides à partir desquelles les PA étaient libérés, plus spécifiquement la réticulation ou non des chaînes de CMA. Pour les besoins de cette analyse, l'influence du DS sur les propriétés des CMA sera tout d'abord traitée de façon indépendante en fonction de la forme solide.

9.1.1 Carboxyméthyl amidons non réticulés : comprimés monolithiques

Les CMA qui ont servi à produire les comprimés monolithiques ont été soit synthétisés par réaction en milieu aqueux (sections 5.2.4 et 5.2.5) ou par réaction diphasique en milieu organique (sections 6.2.4 et 6.2.5). En fonction de ces méthodes de synthèse, les influences du DS et de la structure des CMA sur les propriétés de contrôle de la libération des PA des comprimés monolithiques sont résumées dans la figure 9.1.

Par synthèse aqueuse, il a été trouvé qu'il existait une valeur de DS minimale d'environ 0,14 pour induire un changement de polymorphisme des CMA d'une structure de type-B, présente chez l'amidon natif (Hylon VII), à une structure de type-V. À la différence de la méthode de synthèse en milieu aqueux, tous les CMA et témoins (HAS-0_{NaOH}) produits au moyen de la synthèse en milieu organique possédaient une structure de type-V seulement (figure A.5, Annexe A). Pour ces CMA, le changement de polymorphisme de la structure native de type-

B à la structure de type-V n'était pas induit par la carboxyméthylation des chaînes d'amidon, mais par l'action du NaOH sur les groupes hydroxyles des chaînes d'amidon telle que discutée dans la section 6.2.5.2.5. Ces deux mécanismes de changement de polymorphisme des chaînes d'amidon correspondaient à la différence principale entre les méthodes de synthèse en milieu aqueux et en milieu organique (figure 9.1). Le HAS-0 et le CMA ayant un DS de 0,03 obtenus en phase aqueuse avaient une structure de type-B, expliquant leur insolubilité (figure 5.2), et présentaient des propriétés de désintégrant tel que l'amidon natif (Hylon VII) (figure 5.6). Une certaine valeur minimale de DS pour induire un changement de polymorphisme des CMA synthétisés en milieu aqueux explique pourquoi Calinescu *et al.* (2005) avait déterminé qu'un DS supérieur ou égal à 0,11 était nécessaire pour assurer la libération contrôlée de la bactérie d'*Escherichia coli* chargée dans des comprimés monolithiques. À l'opposé, le HAS-0_{NaOH} possédait une certaine solubilité relative dans l'eau et dans le FGS (figure 6.4) et était capable de soutenir la libération de l'acétaminophène sur une période d'environ 13,5 h indépendamment du milieu de dissolution (FGS ou FIS) (figure 6.6).

La comparaison des profils de dissolution des CMA avec des DS similaires (0,1 à 0,4) produits au moyen des deux différentes méthodes de synthèse (figures 5.6 et 6.6) tend à indiquer que l'augmentation de la valeur du DS des CMA éliminait l'influence de la méthode de synthèse sur les propriétés fonctionnelles des CMA. Le changement de polymorphisme permettait aux CMA avec un DS de 0,14 synthétisés en milieu aqueux de devenir soluble (figure 5.2), de former une couche de gel et ainsi d'être capables de soutenir la libération constante et complète de l'acétaminophène par diffusion sur une période de 17 h. À partir de la valeur minimale de DS de 0,14, l'augmentation du DS jusqu'à une valeur de 0,25 n'induisait pas de modification structurelle détectable des CMA synthétisés en milieu aqueux (figure 5.1) et accélérail la libération de l'acétaminophène. Des résultats très comparables ont été obtenus pour les CMA synthétisés en milieu organique, bien que les paramètres des tests de dissolution différaient entre les deux études (sections 5.2.4.6.3 et 6.2.4.5.3). Le CMA avec un DS de 0,09 synthétisé en milieu organique était capable de soutenir la libération constante et complète de l'acétaminophène par diffusion sur une période d'environ 15 h et l'augmentation de la valeur du DS jusqu'à une valeur de 0,66 accélérail également la

libération de l'acétaminophène, réduisant ainsi le temps nécessaire pour la libération complète de l'acétaminophène à moins de 4 h. Tout comme pour les CMA synthétisés en milieu aqueux, il a été établi qu'il existait une valeur de DS minimale égale à 0,09 pour les CMA synthétisés en milieu organique afin d'assurer les propriétés de contrôle de la libération des médicaments. Toutefois, cette valeur de DS minimale pour les CMA synthétisés en milieu organique était reliée à l'hydratation uniforme de la matrice (figure 6.7) plutôt qu'à la valeur de DS minimale induisant un changement de polymorphisme et l'obtention d'une capacité à soutenir la libération du PA comme celle des CMA synthétisés en milieu aqueux. Cette valeur de DS minimale de 0,09, qui permettait aux comprimés monolithiques à base de CMA synthétisés en milieu organique de ne pas produire le phénomène de « cracking » rapporté pour la première fois par Calinescu *et al.* (2005), est très similaire à la valeur de DS minimale de 0,07 trouvée par Assaad et Mateescu (2010) pour éviter ce phénomène avec des comprimés monolithiques à base de CMA synthétisés en milieu aqueux à partir de Hylon VII prégélatinisé (structure de type-V). Ces valeurs de DS similaires démontrent une fois de plus la similitude entre les propriétés fonctionnelles des CMA faiblement substitués, qu'ils soient synthétisés en milieu aqueux ou en milieu organique (figure 9.1).

Lors de la réalisation de la première étude sur les CMA synthétisés en milieu aqueux (chapitre V), il a été inattendu d'observer que les propriétés de libération de ces CMA n'étaient pas significativement influencées par la valeur de pH du milieu environnant. En fait, à ce moment, la capacité des CMA à moduler les taux de libération des PA dans les différents milieux de dissolution n'avait encore jamais été démontrée explicitement. La faible sensibilité des propriétés de contrôle de la libération des médicaments des CMA faiblement substitués au pH du milieu environnant a été confirmée lors de la deuxième étude (chapitre VI). Avec les CMA synthétisés en milieu organique, il a été inattendu de trouver que la libération de l'acétaminophène à partir des comprimés monolithiques était plus lente dans le FIS que dans le FGS, ce qui était en un sens à l'opposé de l'objectif de la carboxyméthylation des amidons. En fonction de ces résultats obtenus avec l'acétaminophène comme PA modèle (figures 5.6 et 6.6), il semble que les propriétés de gastroprotection des CMA faiblement substitués rapportées par Calinescu *et al.* (2005 ; 2007), Massicotte *et al.* (2008) et De Koninck *et al.* (2009) provenaient de mécanismes passifs (hydratation incomplète de

l'ensemble de la matrice et la libération partielle des PA dans le FGS) plutôt que de mécanismes actifs en fonction de la valeur du pH du milieu environnant.

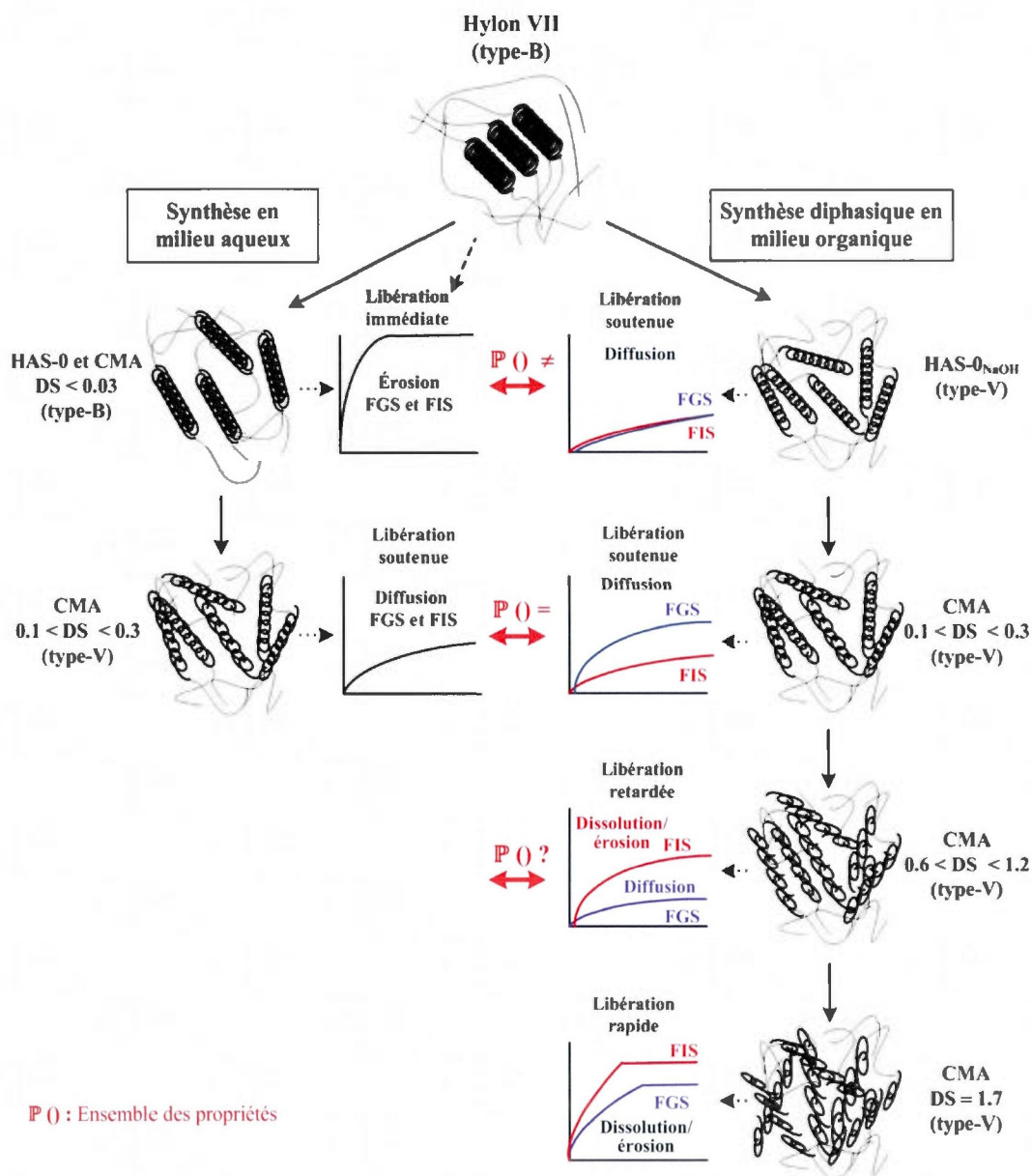


Figure 9.1 Représentation schématique de l'influence du DS sur les propriétés structurales des CMA sous forme de poudre synthétisés en milieu aqueux ou par réaction diphasique en milieu organique à partir d'amidon riche en amylose (Hylon VII) et des mécanismes de contrôle de la libération des médicaments à partir de comprimés monolithiques de CMA dans différents milieux de dissolution (FGS et FIS).

L'augmentation du DS des CMA à des valeurs supérieures à 0,6 a montré que ceux-ci possédaient des propriétés de contrôle de la libération des médicaments très différentes de celles des CMA faiblement substitués lorsque formulés sous forme de comprimés monolithiques. Le changement de méthode de synthèse des CMA, soit d'une carboxyméthylation en milieu aqueux à une carboxyméthylation par réaction diphasique en milieu organique, avait été principalement motivé pour obtenir ces CMA hautement substitués (section 4.5.1) et que leur utilisation comme excipient pour l'élaboration de formes pharmaceutiques solides était, à notre connaissance, une première. À partir d'une valeur de DS de 0,66, il a été trouvé que l'augmentation du DS jusqu'à une valeur de 1,23 diminuait le taux de libération de l'acétaminophène dans le FGS où, pour ce DS, la libération complète de l'acétaminophène par diffusion s'effectuait sur une période de plus de 22 h (figure 6.6a). À l'opposé, la même variation du DS des CMA augmentait le taux de libération de l'acétaminophène dans le FIS où, pour un DS supérieur à 0,89, la libération complète de l'acétaminophène par dissolution et érosion se produisait sur une période inférieure à 3,5 h (figure 6.6b). En d'autres mots, le ratio du temps de libération de l'acétaminophène dans le FGS sur celui dans le FIS augmentait d'une valeur de $1,4 \pm 0,3$ pour un DS à 0,66 à une valeur de $6,0 \pm 0,8$ pour un DS de 1,23. Finalement, il a été trouvé que l'augmentation de la valeur du DS à une valeur de 1,74 produisait une seconde discontinuité dans le profil du $T_{90\%}$ de l'acétaminophène libéré dans le FGS, où pour cette valeur de DS, le temps nécessaire pour la complète libération de l'acétaminophène était réduit à moins de 2 h. Pour des raisons pratiques évidentes (faibles DS et ER), des CMA hautement substitués n'ont pas été synthétisés au moyen de réactions en milieu aqueux et il était donc impossible de vérifier si pour ces CMA la méthode de synthèse avait une influence significative ou non sur leurs propriétés, comme dans le cas des CMA faiblement substitués (figure 9.1). Bien que d'un point de vue théorique, la comparaison de ces méthodes de synthèse pour la production de CMA hautement substitués pourrait être intéressante, devant les multiples avantages de la méthode de synthèse par réaction diphasique en milieu organique (hauts DS et ER, extraction du produit simplifiée), des doutes sont émis sur la pertinence d'une telle comparaison d'un point de vue industriel.

Les différents mécanismes de libération démontrés par comprimés monolithiques et responsables des propriétés fonctionnelles des CMA avec différents DS dans les différents milieux de dissolution ont été discutés exhaustivement dans la section 6.2.5. En résumé, les propriétés de contrôle de la libération des médicaments à partir des CMA correspondaient à la variation du bilan des forces entre les chaînes de CMA en fonction de la valeur du DS et du pH du milieu environnant, conformément à l'hypothèse principale de cette recherche (section 4.2), mais sont de plus en relation avec les taux d'hydratation et de gonflement de la matrice, lesquels sont également fonction de la valeur du DS et du pH du milieu environnant. Sous des conditions neutres (pH 6,8), l'augmentation des forces répulsives entre les groupes carboxylates des chaînes de CMA avec l'augmentation du DS accélérerait l'hydratation et le gonflement de la matrice et conséquemment, le taux de libération de l'acétaminophène. Par contre, sous des conditions acides (pH 1,0) l'augmentation des forces attractives (ponts hydrogène) entre les groupes carboxyliques des chaînes de CMA avec l'augmentation du DS était, dans un premier temps, contrebalancée par l'augmentation de la dissolution ou de l'érosion de la couche de gel à la surface des comprimés associée à l'accélération de l'hydratation de la matrice avec l'augmentation du DS. Ceci avait pour conséquence d'accélérer les taux de libération de l'acétaminophène jusqu'à une valeur maximale d'approximativement 21,4 mg/h pour un DS de 0,42. Par la suite, l'augmentation de la valeur du DS renversait l'équilibre entre les forces d'érosion ou de dissolution et les forces attractives, ce qui diminuait les taux de libération de l'acétaminophène jusqu'à une valeur minimale approximativement de 4,4 mg/h pour un DS de 1,23. Finalement, l'augmentation significative de la solubilité de CMA avec un DS de 1,74 dans le FGS (figure 6.4) renversait de nouveau l'équilibre des forces et expliquait l'accélération du taux de libération de l'acétaminophène par des mécanismes de dissolution et d'érosion associés à l'hydratation rapide de la matrice (figure 6.6a).

Ce dernier CMA avait également la particularité d'avoir été le seul synthétisé au moyen de deux réactions de carboxyméthylation successives (sections 4.5.1, 6.2.4 et 6.2.5). Les résultats obtenus dans cette recherche ne permettent pas d'évaluer l'influence relative de la valeur du DS par rapport à celle de la double carboxyméthylation sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des CMA. En effet, une exposition prolongée des amidons à de

fortes conditions alcalines peut influencer significativement leurs propriétés physico-chimiques, particulièrement leur reprise d'eau à l'équilibre et leur solubilité dues au lessivage partiel de l'amylose et à l'hydrolyse partielle probable des chaînes d'amidon (Lai *et al.*, 2002 ; Lai *et al.*, 2004 ; Nor Nadiha *et al.*, 2010). De tels phénomènes se soient produits lors de la production du CMA avec un DS de 1,74 et aient ainsi influencé les propriétés de contrôle de la libération des médicaments de ces CMA. Afin de permettre la synthèse de CMA hautement substitué de façon plus efficace, la méthode de synthèse par réaction diphasique en milieu organique a été modifiée pour produire les CMA utilisés subséquemment pour générer les MS-CMA (section 8.2.5). Cette modification de méthode consistait à changer le mode de réaction semi-discontinue, soit l'ajout du NaOH suivi après une période de temps donnée de l'addition du MCA(Na) dans le milieu réactionnel (section 4.5.1), à un mode de réaction continue, soit l'ajout du NaOH suivi après une période de temps donnée de l'addition lente et continue du MCA(Na) dans le milieu réactionnel à un débit de 2,0 g/min. Sous ce nouveau mode opératoire, avec un ratio de GU/NaOH/MCA(Na) de 1,0/2,0/2,0 et des paramètres de réaction identiques, il a été possible d'augmenter la valeur maximale du DS atteignable au cours d'une seule synthèse, soit de 1,23, obtenue avec le mode semi-discontinu, à une valeur de 1,45 et d'augmenter l'ER de 61% à 72%. Il est à noter que le débit d'addition du MCA(Na) (2,0 g/min) n'a pas été optimisé. Il serait donc possible d'améliorer encore plus cette méthode de synthèse pour ainsi obtenir des CMA avec des DS encore plus élevés, comparables à ceux obtenus au moyen de carboxyméthylations successives et ce, tout en minimisant leur temps d'exposition au NaOH. De façon encore plus radicale, afin de maximiser la valeur de DS et l'ER tout en minimisant le temps d'exposition au NaOH et de contrôler la teneur en eau dans le milieu réactionnel afin d'éviter l'agglomération des CMA, il serait intéressant de développer un réacteur à écoulement à piston doté d'une membrane de séparation, similaire à ceux déjà utilisés dans l'industrie pour la modification de certains polysaccharides (Jeon et Kim, 2000 ; Zhu, Minet et Tsotsis, 1996). Les CMA très hautement substitués produits au moyen de ces méthodes de synthèse par réaction diphasique en milieu organique optimisées ou modifiées posséderaient des propriétés de contrôle de libération des médicaments différentes de celles obtenues pour le CMA avec un DS 1,74 dans le chapitre VI.

Il a été trouvé, *a posteriori* à la réalisation des études présentées dans les chapitres V et VI, que l'augmentation de la valeur du DS des CMA jusqu'à de hautes valeurs avait également une influence sur la structure des CMA. En effet, la figure A. 5 montre qu'à partir du HAS-0, la position du premier pic du diffractogramme à $14,4\ 2\theta$ ($7,0\ \text{\AA}$) est déplacée à $13,2\ 2\theta$ ($7,9\ \text{\AA}$) pour un CMA avec un DS de 1,5. Cette figure montre également que pour la même variation de DS, l'aire sous le diffractogramme entre 5 et $35\ 2\theta$ diminuait avec l'augmentation du DS. La position du premier pic des amidons avec une structure de type-V correspond à la valeur du rayon de la simple hélice (Zobel, 1988b) et donc, l'augmentation de la valeur du DS des CMA induit une augmentation du rayon de la simple hélice. La valeur de l'aire sous le diffractogramme entre 5 et $35\ 2\theta$ peut être associée à un indice relatif du niveau d'amorphie de la structure, *i.e.* que plus cette valeur est faible, plus le polymère est amorphe. Ainsi, l'augmentation de la valeur du DS augmenterait l'amorphie des CMA. L'encombrement stérique causé par la présence croissante des groupes CM sur les chaînes de polymères avec l'augmentation du DS des CMA explique probablement ce phénomène, lequel a sûrement une influence sur l'augmentation de la solubilité relative des CMA (figure 6.4) et sur les taux de libération des médicaments à partir des comprimés monolithiques à base de CMA (figure 6.6) observés avec l'augmentation de la valeur du DS.

L'ensemble des résultats obtenus dans les chapitres V et VI montre que le DS a une influence significative sur la structure des CMA non réticulés, laquelle influe sur les propriétés fonctionnelles des formes pharmaceutiques à base de CMA. La méthode de synthèse des CMA a, quant à elle, une influence sur la structure des polymères très faiblement ou non substitués, mais qu'elle semble devenir négligeable avec une légère augmentation de la valeur du DS. Finalement, ces résultats montrent que les CMA faiblement substitués ($0,1 < \text{DS} < 0,3$), synthétisés soit en milieu aqueux ou en milieu organique et qui possédaient une structure de type-V, étaient des excipients appropriés pour des applications de libération soutenue des médicaments, tandis que les CMA hautement substitués ($0,9 < \text{DS} < 1,2$) et synthétisés en milieu organique étaient des excipients appropriés pour des applications de libération retardée des médicaments. Ces CMA hautement substitués sont de plus intéressants pour le développement de formes pharmaceutiques solides autres que les comprimés

monolithiques, puisque leurs propriétés de contrôle de la libération des médicaments correspondaient à celles attendues pour les CMA et qu'ils présentent une résistance accrue à l'amylolyse par l' α -amylase (figure 6.9).

9.1.2 Carboxyméthyl amidons réticulés : microsphères

Afin d'étendre les champs d'application des CMA pour l'élaboration de formes pharmaceutiques solides, des microsphères mucoadhésives ont été produites à partir de CMA synthétisés par réaction diphasique en milieu organique dont les DS variaient de 0 à 1,5. Ces MS-CMA ont été produites au moyen d'un procédé d'émulsion-réticulation, où le STMP était utilisé comme agent de réticulation (section 4.5.2). Ce procédé était le seul qui permettait aux microsphères de former un hydrogel stable dans les milieux de dissolution (figure 4.6). Toutefois, le recours à l'émulsion-réticulation comme méthode de production des MS-CMA n'était pas parmi celles à l'origine souhaitées dans le cadre de cette recherche puisque la réticulation des chaînes de CMA pouvait potentiellement modifier significativement les propriétés fonctionnelles des CMA non réticulés préalablement établies. Rappelons que les CMA réticulés sont abondamment utilisés dans l'industrie pharmaceutique comme désintégrant (section 3.3.1).

Les résultats obtenus dans le chapitre VIII ont confirmé que la réticulation des chaînes de CMA pouvait avoir une influence significative sur les propriétés de contrôle de la libération des médicaments à partir des formes solides à base de CMA. Spécifiquement, il a été trouvé que les propriétés de contrôle de la libération sous des conditions acides (pH 1,0) à partir des MS-CMA différaient de celles des comprimés monolithiques à base de CMA non réticulés. En effet, le $T_{90\%}$ de la furosémide libérée dans le HBSS pH 1,0 augmentait proportionnellement avec l'augmentation de la valeur du DS (figures 8.4 et 9.2). Ceci s'explique par le fait que les MS-CMA hydratées étaient insolubles dans ce milieu de dissolution dû aux liens physiques entre les chaînes de CMA. Par conséquent, l'augmentation proportionnelle du $T_{90\%}$ de la furosémide avec l'augmentation de la valeur du DS était probablement due à l'augmentation des forces associatives (ponts hydrogène) entre les chaînes de CMA induites par cette augmentation du DS des MS-CMA. Pour les MS-CMA, les propriétés de contrôle de la libération des médicaments correspondaient à celles spécifiées

dans l'hypothèse principale de cette recherche (section 4.2). Les $T_{90\%}$ de la furosémide libérée à partir des MS-CMA dans le HBSS pH 1,0 (figure 8.4a) étaient approximativement 4 à 10 fois supérieurs aux $T_{90\%}$ de la furosémide libérée dans le HBSS pH 7,2 (figure 8.4b) pour un DS de 0,1 à 1,5. Ces résultats montrent que, malgré l'influence de la réticulation des chaînes de CMA sur les propriétés de contrôle de la libération des médicaments des MS-CMA, la valeur du DS est toujours un facteur majeur influençant les propriétés des MS-CMA. Ainsi, les CMA réticulés et fortement substitués possèdent des propriétés intéressantes de contrôle de la libération des médicaments pour des applications de libération retardée.

Il a également été trouvé que la réticulation des chaînes d'amidon avait une influence dominante en comparaison à l'influence de la valeur du DS sur les propriétés structurales des MS-CMA. L'influence de la réticulation des chaînes sur les propriétés structurales de l'amidon riche en amylose (Hylon VII) a été exhaustivement étudiée par Dumoulin *et al.* (1998) et Ispas-Szabo *et al.* (1999) où ils ont démontré que l'augmentation de la réticulation des chaînes d'amidon induisait, dans un premier temps, un changement de polymorphisme des amidons d'une structure de type-B à une structure de type-V, similairement à l'action de la carboxyméthylation des amidons en milieu aqueux (figure 5.1) et induisait, dans un second temps, une augmentation de l'amorphicité des amidons. Les MS-CMA produites à partir du HAS-0 et à partir des CMA avec des DS de 0,1 à 1,5 possédaient toutes une structure amorphe fortement prédominante (figures 8.3 et A. 6), où l'aire sous la courbe des diffractogrammes était grandement inférieure à celle de leur CMA respectif sous forme de poudre (figure A. 5). Les pics caractéristiques de la structure de type-V sont clairement identifiables sur les diffractogrammes des MS-CMA, mais leur intensité était faible et diminuait avec l'augmentation de la valeur du DS (figure A. 6). Toutefois, étant donné que toutes les MS-CMA avaient une structure similaire et qu'il n'a pas été possible de produire des MS-CMA qui possédaient une conformation structurale différente, il n'est pas possible d'évaluer l'influence de cette structure sur les propriétés de contrôle de la libération des médicaments et de mucoadhésion des MS-CMA.

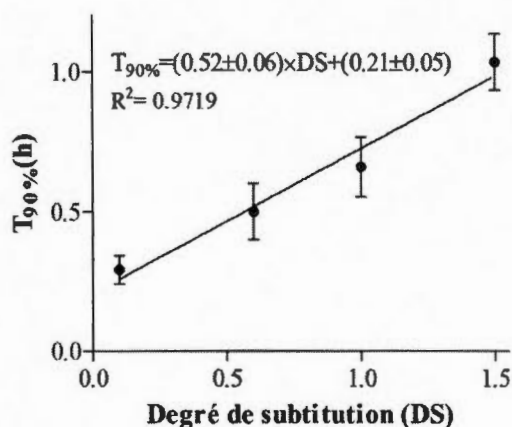


Figure 9.2 Temps pour la libération de 90 % de la furosémide ($T_{90\%}$, h) à partir des MS-CMA dans le HBSS pH 1,0 en fonction de la valeur du DS des MS-CMA.

Toutefois, les tests de mucoadhésivité des MS-CMA (section 8.2.5.10) ont montré que les valeurs de DS des MS-CMA pouvaient influencer cette propriété (figure 8.7). Spécifiquement, il a été trouvé que la mucoadhésion des MS-CMA sur les muqueuses gastriques maintenues sous des conditions acides augmentait avec l'élévation du DS jusqu'à une valeur supérieure à 55% avec un DS de 1,0 (figure 8.7a), ce qui était conforme à l'hypothèse selon laquelle l'augmentation du DS augmentait le potentiel de formation de ponts hydrogène entre les groupes CM protonnés et les mucines composant les muqueuses gastriques (sections 4.2 et 8.2.6). Cependant, l'augmentation du DS des MS-CMA à une valeur de 1,5 diminuait la mucoadhésivité de ces MS-CMA sur les muqueuses gastriques, probablement dû à une plus grande affinité entre les chaînes de CMA qu'avec les mucines de la muqueuse gastrique ou à une conformation spatiale particulière des chaînes de CMA induites par la dimérisation des groupes carboxyliques laissant moins de sites d'interaction adhésifs disponibles pour la mucoadhésion. De façon similaire, les MS-CMA, peu importe la valeur du DS, présentaient de mauvaises propriétés mucoadhésives (< 10%) sur les muqueuses intestinales dû à la forte hydratation des microsphères dans ce milieu (figure 8.7b). Ces propriétés de mucoadhésion des MS-CMA conjointement aux propriétés de contrôle de la libération des médicaments montrent que les CMA avec des DS entre 0,6 et 1,0 sont plus appropriés comme excipient pour l'élaboration de microsphères mucoadhésives gastro-rétentives.

L'ensemble des résultats obtenus dans le chapitre VIII montrent que, tout comme les CMA non réticulés, les propriétés fonctionnelles des MS-CMA composées de CMA réticulés sont principalement définies par la valeur du DS des CMA et que la réticulation a une influence similaire sur les propriétés de libération ou structurelles des MS-CMA indépendamment de la valeur du DS.

9.1.3 Carboxyméthyl amidon non réticulés vs. réticulés

Les résultats obtenus dans cette recherche ne permettent pas de définir si la réticulation ou non des CMA permet à l'une des deux formes d'être supérieure à l'autre. En fait, de l'avis de l'auteur de cette thèse, le choix de ces formes de CMA pour l'élaboration de formulation à administration orale et à libération contrôlée ne se définit pas en termes de performance, mais en termes des propriétés souhaitées pour les formulations. Ainsi, la réticulation ou non des CMA offre un autre degré de liberté conjointement avec la valeur du DS aux formulateurs de l'industrie pharmaceutique et des biotechnologies pour le développement de formes pharmaceutiques robustes et performantes. De plus, les résultats présentés dans cette thèse indiquent que les CMA hautement substitués semblent posséder des propriétés plus intéressantes et spécifiques pour l'élaboration de formulations à administration orale et à libération contrôlée.

9.2 Influence de la forme (acide ou sodique)

Au début de cette recherche, les CMA étaient utilisés uniquement sous leur forme sodique pour produire des formes pharmaceutiques solides. Dans le but de déterminer si la forme acide (protonée) des CMA posséderait des propriétés intéressantes pour le contrôle de la libération de médicaments, des tests de dissolution de l'acétaminophène à partir de comprimés monolithiques de CMA(H) avec des valeurs de DS allant jusqu'à 1,74 ont été effectués (figure 6.8). Pour les raisons explicitées et discutées dans la section 6.2.5.3.2, il a été établi que les CMA(H) ne possédaient pas des propriétés physico-chimiques compatibles avec l'administration contrôlée des médicaments où pour la très grande majorité des DS, une libération immédiate (< 15 min) de l'acétaminophène a été mesurée. Il est intéressant de constater que les résultats obtenus en parallèle à la réalisation de cette thèse par Assaad et

Mateescu (2010) ont renforcé le manque de propriétés compatibles des CMA(H) en tant qu'excipient à libération contrôlée. En effet, ils ont trouvé que les $T_{90\%}$ de l'acétaminophène libéré à partir de comprimés monolithiques de CMA avec des DS inférieurs à 0,2 sous forme acide diminuaient avec le temps d'entreposage desdits CMA(H) suite à leur synthèse et à leur conversion par traitement acide (figure 9.3a). Cette diminution des $T_{90\%}$ était attribuable à l'altération dans le temps de la structure cristalline des CMA (figure 9.3b) qui induisait une réduction significative de la solubilité des CMA(H) (figure 9.3c). Il est important de spécifier que cette altération de la structure cristalline concerne uniquement la forme acide des CMA et qu'un tel phénomène n'a pas été observé pour les CMA sous forme sodique (Assaad et Mateescu, 2010).

Dans le cadre de cette recherche, le temps et les conditions d'entreposage à des CMA(H) n'a pas été exactement mesuré, mais variait d'une période de 3 à 6 mois. Pendant cette période, des modifications des propriétés structurales et physico-chimiques similaires ont pu se produire à l'intérieur des CMA(H) expliquant l'incompatibilité de ceux-ci avec les applications pour le contrôle de la libération des médicaments qui résultait de leur faible solubilité (figure 6.4), de leur faible teneur en eau (figure 6.3) ainsi que de la faible dureté des comprimés monolithiques (figure 6.5b). De plus, il est fort probable que ces modifications des propriétés des CMA(H) avec des DS jusqu'à une valeur de 1,74 aient pu être accélérées et plus importantes, puisqu'il a également été démontré par Assaad et Mateescu (2010) que le taux d'altération de la structure des CMA(H) augmentait avec l'augmentation du DS jusqu'à une valeur de 0,2. Les résultats obtenus dans cette thèse ont semé de sérieux questionnements sur la perspective d'utilisation des CMA(H) pour l'élaboration de formes pharmaceutiques solides à libération contrôlée, lesquels doutes ont été par la suite confirmés. À la lumière de l'ensemble des résultats obtenus au sujet de la caractérisation des propriétés structurales, physico-chimiques et fonctionnelles des CMA(H), de l'avis de l'auteur de cette thèse, il est possible de se questionner sur l'utilisation des CMA partiellement ou totalement sous forme acide en tant qu'excipient dans l'industrie pharmaceutique, peu importe leur fonction ou la forme pharmaceutique solide, dû à l'instabilité potentielle de leurs propriétés structurales et physico-chimiques. Cependant, la forme sodique des CMA reste un matériau de choix comme excipient pour les formes solides ou pour les microsphères gastro-rétentives.

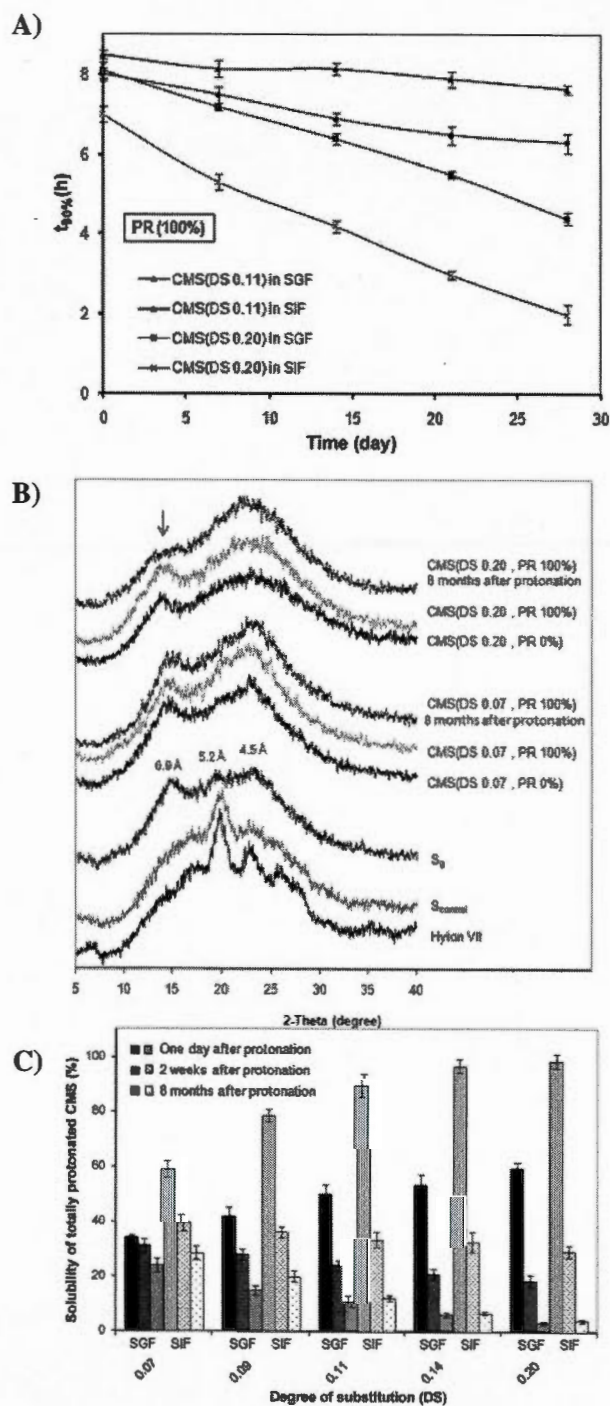


Figure 9.3 Effet du temps d'entreposage et de la valeur du DS des CMA(H) totalement protonnés (forme acide) sur (A) la structure des CMA, (B) la solubilité dans le FGS et le FIS (respectivement SGF et SIF sur la figure) et (C) le $T_{90\%}$ de libération de l'acétaminophène (chargé à 20 %w/w) à partir de comprimés monolithiques (200 mg) dans le FGS et le FIS (Assaad et Mateescu, 2010).

9.3 Influence des propriétés physico-chimiques

Tout au long de cette recherche, une attention particulière a été portée à la caractérisation interdépendante des propriétés physico-chimiques des CMA et des formulations à base de CMA ainsi que leurs influences subséquentes sur les propriétés fonctionnelles de ces formulations solides. Cette caractérisation a permis de confirmer l'hypothèse (section 4.2) que les différentes méthodes de séchage (SP, SA et Ly) et de synthèse (réaction en milieu aqueux et organique), la forme (sodique ou acide) et la valeur de DS des CMA étudiés dans les chapitres V et VI pouvaient avoir des influences significatives sur la morphologie et les caractéristiques de surface des particules de CMA (figures 5.1 et 6.2) ainsi que sur la granulométrie, les densités, les caractéristiques d'écoulement et la teneur en eau des poudres de CMA (tableaux 5.1, 5.2 et 6.1, figure 6.3). Ces caractéristiques pouvaient influencer à leur tour significativement les propriétés physiques, telles la dureté et la friabilité, des comprimés monolithiques à base de CMA (figures 5.5 et 6.5). Il a été trouvé que la grande majorité des CMA possédaient de bonnes propriétés de compression directe. Les structures des CMA (figures 5.1 et A. 5) étaient indépendantes des influences mentionnées ci-dessus. Dans le cas des MS-CMA, le DS avait une influence sur la teneur en eau à l'intérieur des microsphères (figure 8.2d) et sur la reprise d'eau à l'équilibre dans les différents milieux (figures 8.2e et 8.8). Les autres propriétés physico-chimiques des MS-CMA, soit la morphologie (figure 8.2a), la granulométrie (tableau 8.1), la densité (figure 8.2b), la teneur de PA (figure 8.2c) et les propriétés structurales des MS-CMA étaient dépendantes de la méthode de production des microsphères par émulsion-réticulation et des paramètres de production utilisés (figure 4.7).

La détermination des profils de dissolution de l'acétaminophène libéré à partir de comprimés monolithiques (figures 5.6, 6.6 et 6.8) a montré que les propriétés physico-chimiques des CMA avaient également des influences sur les propriétés fonctionnelles des formulations à base de CMA, où ces propriétés physico-chimiques déterminaient le taux d'hydratation des matrices de CMA. La microporosité des particules de CMA(Ly) (figure 5.3) ainsi que les raisons mentionnées précédemment dans la section 9.2 pour les CMA(H) entraînaient une hydratation rapide des matrices de CMA, supprimant les forces de cohésion entre les particules et induisant un gonflement rapide. Ceci fait qu'il n'y a pas la formation d'une

couche de gel à la surface des comprimés (dans le FGS) ou d'une matrice gélifiée (dans le FIS), impartissant aux comprimés des propriétés de contrôle de la libération de l'acétaminophène. Cette propriété d'agent de désintégration a exclu ces grades de CMA(H) pour la production des formes pharmaceutiques solides. Toutefois, l'exclusion de la méthode de séchage des CMA par lyophilisation n'est pas un mal en soi, puisque cette méthode de séchage est industriellement l'une des plus coûteuses et des moins robustes (Cherian et Corona, 2006). Tous les autres CMA et témoins qui possédaient une structure de type-V ont permis la formation d'une couche de gel à la surface des comprimés ou d'une matrice gélifiée et présentaient tous une capacité relative de contrôle de la libération de l'acétaminophène. Il a été discuté dans la section 6.2.4.5.3 qu'il apparaissait que la dureté des comprimés monolithiques avait une influence limitée sur les profils de dissolution de l'acétaminophène à partir de CMA avec des DS élevés. Si les propriétés physico-chimiques des CMA et des formulations à base de CMA permettent la formation de la couche de gel à la surface des comprimés ou d'une matrice gélifiée, l'influence des propriétés physico-chimiques sur les propriétés de libération des CMA semble être faible, voire même négligeable en rapport à l'influence de la valeur du DS (section 9.1). Cet aspect est intéressant d'un point de vue industriel, car il démontre qu'il serait probablement possible d'ajuster les propriétés physico-chimiques des CMA, au cours de leur synthèse ou à la suite de celle-ci, selon les besoins des formulations et des méthodes de production sans influencer significativement les propriétés de contrôle de libération de ces formulations.

Pour les MS-CMA, il a été trouvé que seule la reprise d'eau à l'équilibre avait une influence sur leurs propriétés mucoadhésives (figure 8.7). Cette propriété physico-chimique était influencée par la valeur du DS des CMA. Les propriétés fonctionnelles des formes pharmaceutiques solides à base de CMA sont majoritairement gouvernées par la valeur du DS des CMA si et seulement si les propriétés physico-chimiques des CMA permettent l'établissement des mécanismes de contrôle de la libération des médicaments. Les propriétés fonctionnelles des CMA pour des applications différentes de celles pharmaceutiques étaient, elles aussi, également contrôlées par la valeur du DS des CMA (Heinze et Koschella, 2005 ; Kwon *et al.*, 1997 ; Sangseethong, Ketsilp et Sriroth, 2005).

9.4 Le carboxyméthyl amidon, un excipient multifonctionnel

Les excipients multifonctionnels possèdent de nombreux avantages par rapport aux excipients traditionnels (tableau 2.2). Selon l'ensemble des résultats obtenus, le CMA est un excipient multifonctionnel en vertu des critères présentés dans la section 2.3. Les bonnes propriétés de compression de la majorité des CMA utilisés comme excipient exclusif pour produire les comprimés monolithiques (figures 5.5 et 6.5) et les propriétés fonctionnelles de ces comprimés (figures 5.6, 6.6, et 6.9) rencontrent le critère de rôle multiple à l'intérieur d'une formulation (agent de remplissage, liant, agent pour retarder la libération des PA ou pour soutenir, dans le temps, la libération des PA) en plus de l'avantage de ne recourir à aucun procédé complexe pour son utilisation. Bien que le procédé de production des microsphères par émulsion-réticulation soit un procédé plus complexe que la compression directe, il a été relativement aisé de développer les MS-CMA. De plus, il a été possible de produire des MS-CMA avec plusieurs autres procédés qui impliquaient différents mécanismes de mise en forme, de transfert de matière et de transfert d'énergie (section 4.5.2). Cette versatilité dans les possibilités de mise en forme des CMA et les rôles multiples des CMA à l'intérieur des formulations montrent le caractère multifonctionnel des CMA. Il est même rationnel de croire que les CMA possèdent des propriétés supplémentaires intéressantes pour d'autres méthodes de production des formulations pharmaceutiques telles que la granulation sèche dû à leur grande compressibilité et la granulation humide dû à leur pouvoir liant lorsqu'ils sont suffisamment hydratés. Pour ces procédés, la valeur du DS pourrait être choisi de façon à promouvoir certaines propriétés des CMA d'un point de vue de production et à promouvoir, bien entendu, les propriétés fonctionnelles des formes solides désirées.

La possibilité de moduler les propriétés fonctionnelles des CMA en fonction de la valeur de leur DS représente un autre avantage des CMA. L'équation (2) montre que les risques d'incompatibilité entre les excipients et les PA augmentent exponentiellement avec le nombre d'excipients dans la formulation. Avec les CMA, par la sélection de la valeur du DS, il est possible de les utiliser exclusivement dans les formulations et d'obtenir les propriétés fonctionnelles désirées tout en réduisant le potentiel de risque d'incompatibilité. Il est même envisageable d'utiliser dans une seule formulation des CMA avec différentes valeurs de DS

pour optimiser, si besoin, les propriétés des formulations. Dans ce cas les risques d'incompatibilité ne seraient pas augmentés puisque tous les excipients seraient structurellement et chimiquement semblables.

Un autre critère que doivent satisfaire les excipients pour être qualifiés de multifonctionnels est de transmettre leurs hautes caractéristiques de performance à l'ensemble de la formulation. Les résultats d'augmentation de la solubilité (figure 8.4) et de la perméabilité transépithéliale de la furosémide chargée dans les MS-CMA (figure 8.6) permettent d'affirmer que le CMA rencontre ce critère. De plus, au cours de cette étude, il a été montré que les CMA avaient un faible potentiel cytotoxique peu importe la valeur du DS (figures 8.5b, d et 8.9), permettaient d'ouvrir de façon totalement réversible les jonctions serrées de barrières épithéliales intestinales modèles du TGI (figure 8.5c) et possédaient de bonnes propriétés mucoadhésives pour des DS élevés (0,6 à 1,0) sur les muqueuses gastriques (figure 8.7a). La grande capacité des CMA avec des DS élevés (0,9 à 1,2) formulés sous forme de comprimés monolithiques à moduler les taux de libération des PA en fonction du pH du milieu environnant (Figure 6.6) et celle des CMA faiblement substitués (0,1 à 0,3) synthétisés en milieu aqueux ou organique à permettre une libération soutenue des PA (figures 5.6 et 6.6) montrent que les CMA rencontrent le critère de transmission de ces caractéristiques aux formulations, propres aux excipients multifonctionnels.

Le dernier critère mentionné dans la section 2.2.2 pour qualifier les excipients de multifonctionnels est que l'excipient doit avoir de hautes performances de production inhérentes. Ce critère n'a pas été évalué au cours de cette recherche puisque les formulations à base de CMA ont toutes été produites à l'échelle de laboratoire. Toutefois, puisque les performances de production des excipients dépendent principalement de leurs propriétés physico-chimiques (Brittain *et al.*, 1991), particulièrement les propriétés d'écoulement des excipients sous forme de poudre (Carr, 1965 ; Hausner, 1967), il est fort probable que les propriétés physico-chimiques des CMA pourront être ajustées tel que discuté précédemment en fonction de ces critères d'augmentation de l'échelle ou du chargement des PA à haute teneur. Les prémisses de la capacité de chargement des PA à haute teneur (de l'ordre de 60%) à l'intérieur des formulations à base de CMA ont déjà été montrées par Mulbacher *et al.*

(2001) pour des CMA faiblement substitués (0,08), réticulés et formulés sous forme de comprimés monolithiques.

Dans le même ordre d'idées, la problématique de comparaison des performances des CMA par rapport à d'autres excipients multifonctionnels (section 4.1) n'a pas été évaluée lors de cette recherche. Toutefois, selon les connaissances de l'auteur de cette thèse, il existe peu d'excipients utilisés actuellement dans l'industrie pharmaceutique qui présentent autant de capacités fonctionnelles ou de potentiel que les CMA. En effet, des excipients multifonctionnels mentionnés dans la section 2.4, l'amidon pré-gélatinisé ne possède pas de propriété à moduler la libération des PA en fonction des conditions environnantes dans le TGI et est très peu mucoadhésifs (Ahuja, Khar et Ali, 1997). Les polyvinyl pyrrolidone réticulés sont utilisés presque qu'exclusivement pour des formulations à libération soutenue (Reza, Quadir et Haider, 2003 ; Rowe, Sheskey et Owen, 2006). Les carboxyméthyl cellulose et les polymères d'acide méthacrylique sont tous deux reconnus comme étant des excipients mucoadhésifs (Bernkop-Schnürch, 2005 ; Harding *et al.*, 1999 ; Lehr *et al.*, 1990), sont capables de moduler la libération des PA en fonction du pH environnant dans le TGI et, comme les CMA, sont disponibles dans une variété de grades ou de DS qui permet de développer des formulations avec des caractéristiques adaptées aux besoins. Toutefois, les carboxyméthyl cellulose ne sont pas assimilables par l'humain et les polymères d'acide méthacrylique sont d'origine purement synthétique. Ces caractéristiques font que ces polymères peuvent présenter des risques accrus d'incompatibilité avec les muqueuses du TGI.

En résumé, les rôles multiples des CMA à l'intérieur des formulations, les bonnes propriétés, en fonction du DS et du pH environnant, de libération soutenue ou de libération retardée, de mucoadhésivité, d'agent augmentant la perméabilité transépithéliale des médicaments et les différentes possibilités de mise en forme des formulations à base de CMA démontrent que le CMA produit soit par réaction en milieu aqueux ou par réaction diphasique en milieu organique, réticulé ou non, est un excipient multifonctionnel de choix pour l'industrie pharmaceutique et des biotechnologies.

9.5 La lignée cellulaire NCI-N87 comme outil *in vitro* pour l'étude de la perméabilité gastrique des médicaments et des interactions avec des formes pharmaceutiques solides

L'étude de faisabilité de l'utilisation de la lignée NCI-N87 comme modèle *in vitro* de la barrière épithéliale gastrique humaine pour l'évaluation de la perméabilité transépithéliale des médicaments était motivée par le fait qu'il n'existait pas de tel modèle couramment utilisé dans l'industrie pharmaceutique ou décrit dans la littérature scientifique. Devant ce fait, nous nous sommes même questionnés sur la pertinence et l'utilité du développement de ce modèle de barrière épithéliale gastrique. Ce questionnement était de plus renforcé par le fait que l'absorption gastrique des PA est généralement faible en comparaison à l'absorption intestinale. Toutefois, dû à l'émergence des formes pharmaceutiques gastro-rétentives (Dehghan et Khan, 2009 ; Pawar *et al.*, 2011) où l'accroissement du temps de résidence gastrique des formes pharmaceutiques augmente le potentiel d'absorption dans l'estomac de certains PA (petites molécules acides ou faiblement basiques), des traitements contre les troubles gastriques (Ahad *et al.*, 2011 ; Shaji *et al.*, 2009 ; Umamaheshwari, Jain et Jain, 2003) et des traitements pour éradiquer *Helicobacter pylori* (Bardonnet *et al.*, 2006 ; Jain et Jangdey, 2008 ; Nama, Gonugunta et Prabhakar, 2008), il a été d'avis que le développement de ce modèle serait pertinent, afin d'ultimement apporter un nouvel outil de caractérisation *in vitro* d'utilisation relativement simple pour faciliter le développement des PA, des traitements de maladies ou d'infections gastriques ainsi que l'élaboration des formes pharmaceutiques gastro-rétentives.

Les résultats obtenus au cours de l'étude de faisabilité présentée au chapitre VII ont confirmé la pertinence d'utiliser la lignée cellulaire NCI-N87 comme modèle de la barrière épithéliale gastrique humaine. Le résultat le plus probant pour démontrer cette pertinence était la résistance des monocouches de cellules NCI-N87 cultivées sur des filtres à la diminution du pH apical, qui permet de se rapprocher des conditions physiologiques existantes dans l'estomac humain. L'application d'un pH apical aussi bas que 3,0 permettait aux monocouches de cellules de conserver leur intégrité et leur imperméabilité au marqueur « Lucifer Yellow » (figure 7.3) malgré une diminution de l'ordre de 60% de la RETE des monocouches de cellules (figure 7.2). Il est également intéressant de constater que cette

diminution de la RETE était réversible similairement à l'action de la cytochalasine D (CD) (figure A. 4). Le mécanisme exact qui permettait aux monocouches de cellules de retrouver leur valeur initiale de RETE demeure pour le moment inconnu, mais peut être probablement attribué à la réhydratation des cellules lors de leur retour dans le milieu de culture à la suite de leur crénation sous les conditions acides (section 7.2.8) ou à la réépithélisation des monocouches de cellules, laquelle peut être complète après une période de moins de 40 h tel que démontré par Chailler *et al.* (2005) lorsque des monocouches de cellules d'un clone de la lignée NCI-N87 sont volontairement abîmées. Selon Chan *et al.* (1989), la résistance aux conditions acides est une propriété générale des monocouches de cellules épithéliales. Toutefois, la comparaison de la viabilité cellulaire des monocouches de cellules NCI-N87 (figure A. 2) à la suite d'un traitement acide à celle des monocouches de cellules Caco-2 (figure A. 3) à la suite du même traitement acide montre le contraire. En effet, plus de 40% des cellules NCI-N87 étaient encore vivantes 20 h après un traitement à pH 3,0, tandis que les cellules Caco-2 ne démontraient plus aucune activité biologique. Les valeurs de viabilité cellulaire ne sont pas extrapolables à la valeur de RETE des monocouches de cellules en fonction du pH, puisqu' au contraire de ces expériences réalisées avec des monocouches de cellules maintenues sur des filtres, les études de viabilité cellulaire ont été réalisées avec des monocouches de cellulesensemencées dans des plaques de 96 puits ce qui peut induire des différences dans le phénotype des cellules NCI-N87, tel que dans la quantité d'agglomérats de mucus produits à leur surface.

Dans le même ordre d'idées, il a été trouvé que les conditions de culture des monocouches de cellules NCI-N87ensemencées sur des filtres de PET avaient une influence considérable sur la valeur de RETE (figure 7.1). Une densité d'ensemencement de $2,5 \times 10^5$ cellules/cm² conjointement au maintien des monocouches dans un milieu composé de RPMI-1640 enrichi de sérum permettaient d'obtenir les valeurs les plus élevées de RETE et stables pour une période de 18 à 27 jours postconfluence ($\approx 500 \Omega \cdot \text{cm}^2$) (figure 7.1a) contrairement au maintien des monocouches de cellules dans des milieux composés de DMEM/F-12 (figure 7.1b) ou de DMEM (figure 7.1c) enrichis de sérum qui n'ont présenté aucune augmentation significative de leur RETE (de 50 à $120 \Omega \cdot \text{cm}^2$) dans le temps, peu importe la densité d'ensemencement. Sous ces conditions optimales de culture, l'augmentation de la RETE a été

attribuée à la polarisation des monocouches de cellules NCI-N87 par la présence probable d'une plus grande quantité d'agglomérats de mucus à la surface des monocouches de cellules (figure 7.1d) ainsi que certainement la localisation appropriée de la protéine ZO-1, marqueur des jonctions serrées, à la périphérie de contact des cellules ainsi qu'à l'augmentation de son expression dans le temps (figures 7.1f et A. 1). Les raisons expliquant les différences de RETE des monocouches de cellules maintenues dans les différents milieux de culture n'ont pas été investiguées dans le cadre de cette recherche, mais peuvent être probablement reliées à la différence de concentration des ions Ca^{2+} entre les différents milieux de culture. Il a été démontré précédemment que la faible concentration de Ca^{2+} dans le RPMI-1640 (0,4 mM) pouvait favoriser la formation des jonctions serrées entre les cellules épithéliales (Kavvada *et al.*, 2005) contrairement à la plus grande concentration de Ca^{2+} dans le DMEM/F-12 ou le DMEM (1,2 mM). L'obtention de monocouches de cellules NCI-N87 avec des propriétés adéquates pour leur utilisation en tant que modèle de la barrière épithéliale gastrique semble très sensibles aux conditions de culture, à la densité d'ensemencement et à l'âge de la monocouche et est aussi sensible, tout comme les autres modèles *in vitro* de barrière épithéliales du TGI, au nombre de passages, au matériel de support du filtre, à la source des composés des milieux de culture, à la température et à la provenance de la lignée. Ces facteurs peuvent induire de fortes différences dans les valeurs des coefficients de perméabilité transépithéliale mesurées (Delie et Rubas, 1997 ; Hubatsch, Ragnarsson et Artursson, 2007 ; Volpe, 2008). Ces différents facteurs expliquent probablement les différences entre les conditions de culture optimales des monocouches de cellule NCI-N87 qui ont été obtenues lors de cette étude et les conditions optimales suggérées dans la littérature précédemment mentionnée (section 4.5). L'établissement d'un protocole standardisé est donc requis pour permettre l'utilisation reproductible de la lignée cellulaire NCI-N87 comme modèle de la barrière épithéliale gastrique.

L'étude de faisabilité présentée au chapitre VII a montré pour la première fois le potentiel d'utilisation de la lignée cellulaire NCI-N87 comme modèle *in vitro* pour évaluer la perméabilité gastrique des PA. Le manuscrit présenté au chapitre VIII a démontré à son tour que cette lignée peut être très utile pour caractériser les interactions entre les barrières épithéliales gastriques et les formes pharmaceutiques solides. Ces différentes applications

dénotent la légitimité et la profitabilité potentielles de ce modèle *in vitro* pour la découverte des nouveaux PA et l'élaboration plus efficace des formulations solides gastro-rétentives. Toutefois, les résultats obtenus demeurent préliminaires et des études supplémentaires sont requises afin de mieux caractériser cette lignée d'un point de vue des fonctions physiologiques gastriques et des mécanismes de transport passif ou actif des PA dans le but de mieux définir la validité de ce modèle ainsi que ces limites d'utilisation et d'application.

9.6 Portée des résultats

La portée des résultats de cette recherche se définit à partir des caractéristiques intrinsèques, des paramètres sélectionnés et des limites des méthodes expérimentales qui ont été utilisées lors des différentes études sur les propriétés des CMA.

9.6.1 Purification des carboxyméthyl amidons

La caractérisation des propriétés a été réalisée sur des CMA pouvant être qualifiés de hautement purifiés, *i.e.* qui ont subi des étapes intensives de nettoyage et de purification à la suite de la réaction de carboxyméthylation. Cette étape de nettoyage avait pour but d'éliminer les réactifs non consommés, les impuretés provenant des réactions secondaires indésirables (hydroxyacétate de sodium, NaCl, équations (3.4) et (3.5)), ainsi que les sels produits lors des étapes de la réaction de carboxyméthylation (NaCl, équation (3.3)) et lors de la neutralisation du milieu réactionnel pour arrêter la réaction (NaCl, sodium acétate). La valeur absolue de la quantité résiduelle de ces impuretés dans les CMA produits n'a pas été quantifiée, mais elle a été assumée comme étant très faible puisqu'à la suite de nombreuses étapes de nettoyage et de purification successives, il n'était plus possible d'extraire une quantité suffisante d'impuretés des particules de CMA pour modifier significativement la valeur de conductivité du mélange de solvant organique et d'eau utilisé pour purifier lesdites particules de CMA. Ainsi, il était possible de soustraire l'influence de ces impuretés lors de la caractérisation des propriétés fonctionnelles des comprimés monolithiques formulés à base de CMA. En effet, tel qu'il a été précédemment discuté dans la section 6.2.5.3.2 lors de la comparaison des profils de dissolution obtenus pour les CMA(Na) (figure 6.6) et les CMA(H) (figure 6.8), la présence d'ions dans la matrice hydratée par les milieux de dissolution influence les taux de

libération des médicaments et même, pour un autre cas spécifique aux CMA, l'addition de cristaux de NaCl à l'intérieur des comprimés monolithiques pouvait modifier radicalement l'hydratation de la matrice, ce qui améliorerait par le fait même leurs propriétés de libération soutenue des PA (Brouillet, Bataille et Cartilier, 2008 ; Brouillet *et al.*, 2010 ; Nabais *et al.*, 2007).

Sous une autre perspective, ces résultats montrent que l'augmentation de la quantité d'impuretés dans les particules de CMA pourrait modifier les propriétés fonctionnelles des comprimés monolithiques à base de CMA hautement purifiés précédemment quantifiés (chapitres V et VI). Cette augmentation des impuretés dans les CMA et dans les formes pharmaceutiques pourraient résulter, à titre d'exemple, à l'augmentation de l'échelle de la synthèse des CMA ou à l'augmentation de la valeur du critère d'arrêt de l'étape de nettoyage pour des raisons économiques. En fonction du taux d'impuretés dans les particules de CMA considéré comme acceptable, il se peut que les valeurs limites de DS des plages recommandées d'utilisation des CMA (section 9.1.1) soient modifiées, ce qui de plus signifie que les propriétés fonctionnelles des formes pharmaceutiques à base de CMA devraient être

toujours établies en corrélation avec la quantité d'impuretés dans les CMA et que les résultats présentés dans cette thèse sont possiblement représentatifs et extrapolables uniquement pour des CMA hautement purifiés ou qui ont une faible quantité d'impuretés.

Une autre raison qui peut induire l'augmentation des impuretés dans les formes pharmaceutiques solides à base de CMA est le mode de production de ces formes ainsi que les paramètres de production utilisés comme dans le cas des MS-CMA. En effet, lors de la production des MS-CMA par émulsion-réticulation (section 8.2.5.3), celles-ci n'ont été que partiellement nettoyées afin de réduire la quantité de furosémide extraite des FU-MS-CMA par l'IPA et donc la présence d'une petite quantité d'impuretés (NaCl ou sels de métaphosphate) a été détectée à l'intérieur de ces microsphères ainsi que dans les PL-MS-CMA nettoyées de façon identique (figures 8.3 et A. 6). La présence de ces sels ait pu avoir une influence, via la modification des taux d'hydratation, sur les propriétés de libération (figure 8.4) et de mucoadhésivité (figure 8.7) des MS-CMA. Similairement, Heb *et al.* (2007)

ont montré que la capacité de gonflement, les propriétés rhéologiques et la résistance à la déformation des hydrogels de CMA réticulés dépendaient significativement du nettoyage ou non des polymères à la suite de leur synthèse. Dans notre cas, les résultats présentés dans le chapitre VIII ne permettaient pas d'évaluer la magnitude de ces impuretés sur les propriétés des MS-CMA, mais en vertu du fait que les niveaux d'impuretés semblent relativement faibles, l'influence de ces impuretés doit être probablement minime en comparaison de l'influence des propriétés physico-chimiques des CMA, particulièrement les DS, ce qui appuie de nouveau le fait que les CMA sont des excipients de choix pour la production de microsphères mucoadhésives pour des systèmes d'administration de médicaments gastro-rétentifs.

9.6.2 Sources d'amidon

La problématique concernant l'utilisation d'un nombre de sources d'amidon limité pour la production des CMA a précédemment été soulevée. Pour être plus précis, seuls les amidons de maïs natif, de maïs riche en amylose (Hylon VII) et de patates ont actuellement servi de sources pour produire les CMA utilisés comme excipient pharmaceutique (tableau 3.3). Cette problématique revêt son importance dû au fait que la source d'amidon peut avoir une influence significative sur la viscosité des solutions de CMA, sur la solubilité et sur la biodégradabilité des CMA (Hebeish, Khalil et Hashem, 1990 ; Ragheb, El-Sayiad et Hebeish, 1997 ; Stojanovic, Jeremic et Jovanovic, 2000 ; Volkert *et al.*, 2004) ce qui subséquemment peut influencer les propriétés de libération des médicaments des formes pharmaceutiques à base de CMA, tel qu'il a été démontré par Onofre *et al.* (2009).

Cette problématique n'a pas été résolue dans cette recherche où tous les CMA ont été synthétisés à partir du Hylon VII. De plus, il n'est pas possible d'effectuer la comparaison entre les profils de dissolution obtenus (figures 5.6, 6.6, 6.8 et 6.9) et les profils de dissolution de comprimés monolithiques à base de CMA synthétisés au moyen d'autres sources d'amidon disponibles dans la littérature, puisque ces formulations possédaient de trop grandes différences avec les formulations utilisées dans les chapitres V et VI. En effet, les comprimés de CMA synthétisés à partir d'un mélange d'amidon de maïs et de patates prégélatinisés étaient additionnés de 17,5 à 27,5 %w/w de NaCl (Brouillet, Bataille et

Cartilier, 2008 ; Brouillet *et al.*, 2010 ; Nabais *et al.*, 2007), tandis que les comprimés de CMA synthétisés à partir d'amidon de maïs natif ou de patates étaient réticulés (Onofre, Wang et Mauromoustakos, 2009). Également, lors de ces études, les paramètres des expériences de dissolution utilisés étaient différents des paramètres utilisés dans les chapitres V et VI. Il est donc important de spécifier devant ces faits que les résultats obtenus et les plages d'utilisation des CMA établis dans cette thèse sont uniquement valides pour les CMA synthétisés à partir de Hylon VII, puisque la modification de cette source d'amidon pourrait induire une modification des propriétés des CMA. Des études comparatives supplémentaires portant explicitement sur l'influence de la source d'amidon sur les propriétés fonctionnelles des formulations à base de CMA devront être réalisées, afin de répondre à cette problématique.

9.6.3 Choix des principes actifs

Les raisons qui justifiaient le choix des PA modèles utilisés dans cette recherche ont été présentées dans la section 4.5. La détermination des profils de dissolution de l'acétaminophène à partir de comprimés monolithiques formulés à base de CMA, dans un premier temps faiblement substitués ($DS < 0,25$) (figure 5.6) et dans un second temps, avec des DS de 0,09 à 1,74 (figures 6.6, 6.8 et 6.9) a respectivement permis de déterminer les influences des méthodes de séchage, de la structure et de l'augmentation de la valeur du DS, de la conversion de la forme sodique en forme acide et la résistance à l'amylolyse par α -amylase sur les propriétés de libération desdits comprimés. Ceci montre que l'utilisation de l'acétaminophène comme PA modèle soluble et neutre était très appropriée pour caractériser les capacités des CMA comme excipient pour le contrôle de la libération des médicaments et plus particulièrement, pour la première fois, à démontrer explicitement la capacité des CMA à moduler le taux de libération des PA en fonction de la valeur du DS et du pH des milieux environnants.

La sélection de la caféine, de la furosémide et du « *Lucifer Yellow* » comme PA modèle pour démontrer la première fois la capacité de la lignée cellulaire NCI-N87 à être utilisée comme modèle *in vitro* de la barrière épithéliale gastrique a également été appropriée, puisque les

coefficients de perméabilité transépithéliale mesurés (figure 7.3) correspondaient à ceux prévus pour ces PA et respectaient « l'hypothèse de partage en fonction du pH » (section 7.2.8).

La profitabilité de la sélection de la furosémide comme PA modèle pour développer les MS-CMA à partir de CMA avec des DS allant jusqu'à une valeur de 1,5 (sections 8.2.5.3 et 8.2.6.1) et par la suite caractériser les propriétés de ces MS-CMA est mitigée. L'utilisation de la furosémide a été appropriée pour démontrer l'innocuité des FU-MS-CMA (figures 8.5b et d) et les capacités des MS-CMA à induire une augmentation de sa perméabilité à travers des modèles de barrière épithéliale NCI-N87 (gastrique) et Caco-2 (intestinale) (figure 8.6) laquelle résultait respectivement de l'augmentation de la solubilité de la furosémide en milieu acide (figure 8.4a) induite par un changement de polymorphisme d'une structure cristalline à une structure amorphe lorsque chargée à l'intérieur des MS-CMA (figure 8.3) ou à l'ouverture des jonctions serrées des monocouches de cellules (figure 8.5d). Il est à noter que la structure amorphe de la furosémide a également été vérifiée en comparant les diffractogrammes présentés (figure 8.3a) avec les diffractogrammes de la furosémide cristalline mélangée à sec à différentes proportions (2.5 à 10% w/w) avec du HAS-0 sous forme de poudre (figure A.9).

La furosémide avait également été sélectionnée comme étant un PA modèle non favorable au MS-CMA (« *worst case scenario* »). Cependant, aucun des résultats présentés dans le chapitre VIII a clairement démontré un caractère non compatible de la furosémide sur les propriétés des MS-CMA puisque les profils de dissolution à partir des MS-CMA n'ont été obtenus qu'avec ce PA modèle (figure 8.4). Dans le cas spécifique des profils de dissolution dans le milieu neutre (figure 8.4b), l'hydratation des MS-CMA était si rapide, qu'il n'a pas été possible de déterminer l'influence en fonction du DS des CMA de la présence de la furosémide à l'intérieur des MS-CMA. L'influence de la furosémide sur les propriétés de mucoadhésion des MS-CMA (figure 8.7) n'a pas été caractérisée dû à une quantité limitée de muqueuses fraîches de porc disponibles. Une utilisation non optimale de la furosémide est due au choix de la production des MS-CMA par émulsion-réticulation qui a résulté en une faible efficacité de chargement, à 50%, de la furosémide à l'intérieur des MS-CMA (figure

8.2c) dû à la dégradation de la furosémide par le NaOH présent dans la phase aqueuse. Dans le contexte du développement d'une véritable formulation pour la furosémide, cette dégradation serait probablement économiquement non satisfaisante ou même incompatible pour l'administration humaine dû à la trop grande quantité de produits de dégradation dans les MS-CMA. La production des MS-CMA par émulsion-réticulation nécessite des PA chargés à l'intérieur des microsphères compatibles avec les conditions qui prévalent dans le milieu réactionnel. Aussi l'utilisation d'un PA modèle avec une faible perméabilité transépithéliale insensible aux conditions basiques aurait été plus appropriée.

9.6.4 De l'*in vitro* à l'*in vivo*

Finalement, les résultats, les analyses, les discussions, les conclusions et les recommandations présentés au cours de cette thèse au sujet des propriétés et des capacités des CMA ainsi que de la lignée cellulaire NCI-N87 comme modèle de la barrière épithéliale gastrique ont été obtenus dans cette étape *in vitro* seulement. Comme présenté dans les chapitres I et II, il existe dans le TGI humain de nombreux paramètres et de nombreuses conditions particulières, parfois variables en fonction du sujet, qui pouvaient fortement influencer les taux de libération des PA, la mucoadhésion des formes pharmaceutiques ainsi que l'absorption des PA à travers des barrières épithéliales. Bien que les méthodes expérimentales *in vitro* utilisées dans cette thèse se voulaient, dans la mesure du possible, les plus représentatives des conditions existantes dans le TGI, il n'en demeure pas moins qu'il est difficile d'extrapoler *in vivo* avec exactitude et hors de tout doute les résultats obtenus dans le contexte de l'administration orale des formulations pharmaceutiques solides à base de CMA, ainsi que les valeurs de perméabilité gastrique des PA chez l'humain. Les conclusions de cette thèse doivent être perçues comme une étape de compréhension nécessaire des propriétés et des capacités des CMA et des cellules NCI-N87 et non pas une définition totale et immuable de ces propriétés. Cette meilleure connaissance des CMA et des cellules NCI-N87 permettra de mieux comprendre et d'analyser les résultats obtenus subséquemment lors de l'utilisation de modèle *in vivo*.

CHAPITRE X

CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES FUTURES

Ce travail de recherche visait à poursuivre le développement des CMA par la caractérisation de leurs propriétés et des propriétés des formulations à base des CMA afin de définir le caractère multifonctionnel et les limites d'application des CMA de faible à haut DS comme nouvel excipient pour des formulations pharmaceutiques solides à administration orale et à libération contrôlée. L'atteinte des objectifs de recherche a été possible par l'emploi de méthodes expérimentales éprouvées, l'adaptation de certaines d'entre elles ainsi que par le développement d'un nouvel outil de caractérisation *in vitro* dans le but d'élaborer des approches méthodologiques systématiques, où les caractéristiques des CMA et des formulations à base de CMA ont été évaluées de façon interdépendante à la fois au niveau de leurs propriétés structurales, physico-chimiques et fonctionnelles. Spécifiquement, il était visé d'étudier les influences du DS, des méthodes de production des CMA (incluant les méthodes de synthèse et les modifications postsynthèse) et des méthodes de production des formulations à base des CMA (comprimés monolithiques et microsphères) sur l'ensemble de ces propriétés.

Les influences des méthodes de séchage (PS, SA et Ly) et de faibles DS ($< 0,25$) sur les propriétés à l'état solide et de libération des médicaments des CMA synthétisés en milieu aqueux ont tout d'abord été étudiées. Il a été trouvé lors de cette étude que seul le DS avait une influence sur les propriétés structurales des CMA, où une valeur de DS supérieure à 0,14 était nécessaire pour induire un changement de polymorphisme de patron de type-B à un patron de type-V à l'intérieur des particules de CMA. Ce changement de polymorphisme

permettait aux CMA de devenir très solubles dans l'eau. La granulométrie, la morphologie et les caractéristiques de surface des particules de CMA ainsi que la densité et les propriétés d'écoulement des poudres de CMA étaient contrôlées à la fois par le DS et par la méthode de séchage. La teneur en eau à l'intérieur des CMA était principalement dépendante de la méthode de séchage. La stabilité thermique des CMA était majoritairement contrôlée par la structure chimique des amidons et influencée légèrement par la valeur du DS. Ces différentes propriétés structurales et physico-chimiques des poudres ont influencé les propriétés physico-chimiques des comprimés monolithiques élaborés à partir des CMA possédant différents DS et séchés au moyen de différentes méthodes, et qui possédaient en majorité des propriétés de compression adéquates. Il a finalement été trouvé que seuls les CMA séchés par PS et SA avec des DS entre 0,14 et 0,25 pouvaient contrôler la libération de l'acétaminophène à partir des comprimés par diffusion sur une période de plus de 17 h et de 10 h respectivement sans être significativement influencée par la méthode de séchage et la variation du pH des milieux de dissolution. Ces résultats suggèrent que, lorsque la méthode de séchage permet d'obtenir des CMA avec des propriétés physico-chimiques adéquates pour la libération contrôlée des médicaments, lesdites propriétés de contrôle de la libération sont en premier lieu contrôlées, par la structure des CMA faiblement substitués, laquelle à son tour est dépendante de la valeur du DS. La faible sensibilité des profils de dissolutions au pH environnant suggère que les CMA avec de faibles DS ($< 0,25$) possèdent des propriétés intéressantes pour l'élaboration de formulations à libération soutenue.

Les influences de l'augmentation du DS, jusqu'à une valeur de 1,74, et de la forme, CMA(NA) ou CMA(H), sur les propriétés physico-chimiques et de libération des médicaments à partir de comprimés à base de CMA synthétisés par réaction diphasique en milieu organique, ont été par la suite étudiées. Cette méthode de synthèse a été l'objet d'un processus d'optimisation afin de déterminer les paramètres d'opération maximisant à la fois la valeur du DS, de l'ER tout en proscrivant l'agglomération des polymères dans le réacteur (section 4.5.1). En utilisant ces paramètres optimaux, la synthèse en milieu organique a permis de produire des CMA avec un DS jusqu'à une valeur de 1,23 avec des ER aussi élevées que 72%. Ceci a confirmé l'avantage de la carboxyméthylation par réaction

diphasique en milieu organique vis-à-vis de la carboxyméthylation en milieu aqueux telle que précédemment utilisée pour obtenir des CMA avec un DS maximal de 0,25 avec une ER de 30%.

Toujours par synthèse en milieu organique, un CMA avec un DS de 1,74 a également été produit au moyen de deux réactions de carboxyméthylation successives (DS de 0 à 1,23 lors de la première réaction et de 1,23 à 1,74 lors de la seconde), mais pour lesquelles l'ER globale a été significativement inférieure (43,5%). Spécifiquement, lors de cette étude, il a été trouvé que le DS et la conversion des CMA de la forme CMA(Na) à la forme CMA(H) avaient des impacts majeurs sur les propriétés physico-chimiques des CMA ainsi que sur des comprimés monolithiques à base de ces CMA, où il ressort que les CMA produits par synthèse en milieu organique semblent être également des excipients adéquats pour le procédé de compression directe. Les tests de dissolution de l'acétaminophène effectués dans le FGS, le FIS et le FIS_{PAN} ont montré que seuls les CMA(Na) semblent être appropriés pour l'élaboration de formes pharmaceutiques solides à administration orale pour la libération contrôlée. Ces tests de dissolution ont également montré que les CMA(Na) étaient des matrices sensibles au pH. Dans le FGS, le T_{90%} de l'acétaminophène libéré au travers une couche de gel à la surface des comprimés diminuait à partir d'une valeur d'environ 8 h jusqu'à une valeur d'environ 3,5 h pour un DS de 0,09 à 0,42. Consécutivement, l'augmentation du DS jusqu'à une valeur de 1,23 augmentait le T_{90%} jusqu'à une valeur maximale de plus de 17,5 h. Finalement, l'augmentation du DS à une valeur supérieure (1,74) diminuait significativement le T_{90%} à moins de 1,5 h. Cette variation non linéaire du T_{90%} était probablement reliée à l'équilibre des forces attractives entre les chaînes de CMA vis-à-vis de la solubilité relative des CMA dans le FGS qui augmentait avec le DS. Dans le FIS, le T_{90%} de l'acétaminophène libéré au travers d'une matrice gélifiée diminuait avec l'augmentation du DS soit de 12 h à moins de 1,2 h à des DS de 0,09 à 1,74. La comparaison des profils de dissolution obtenus dans le FIS et le FIS_{PAN} a montré que l'action de l' α -amylase diminuait le T_{90%} de l'acétaminophène, mais que la magnitude relative de cette influence diminuait avec la

valeur du DS jusqu'à une valeur de 0,42. Au-delà de ce DS, l' α -amylase n'avait plus d'influence sur les profils de dissolution, puisque la libération du PA était déjà contrôlée par des mécanismes rapides de dissolution des matrices de CMA.

L'analyse globale de ces résultats obtenus au cours de ces deux premières études a montré que l'utilisation des CMA comme excipient pour l'élaboration de comprimés monolithiques semble être optimale pour deux plages de DS. Les CMA possédant de faibles DS (entre 0,1 et 0,25) obtenus par synthèse aqueuse ou en milieu organique peuvent être utilisés pour l'élaboration de formes à libération soutenue pour lesquelles les CMA présentent les avantages de pouvoir ajuster les profils de dissolution en fonction du DS et une résistance accrue à la bioérosion par l' α -amylase vis-à-vis de l'amidon gélifié (HAS-0). Les CMA possédant des DS élevés (entre 0,9 et 1,2) synthétisés en milieu organique peuvent être, quant à eux, des excipients de choix pour l'élaboration de formulations à libération retardée, puisque les taux de libération du PA dans le FGS étaient significativement inférieurs à ceux dans le FIS. Il est à noter que ces plages d'utilisation ont été déterminées en utilisant un PA modèle (l'acétaminophène) soluble et neutre dans les différents milieux de dissolution. La formulation des CMA sous forme de comprimés monolithiques avec d'autres PA possédant des propriétés différentes peut modifier les valeurs limites de DS de ces plages d'utilisation. Toutefois, en vertu de l'étendue des valeurs de DS des CMA qu'il est possible d'obtenir, il est rationnel d'envisager que pour chaque PA, il existe des valeurs optimales de DS pouvant assurer la libération soutenue ou retardée desdits PA. Dans le même ordre d'idées, il serait intéressant de vérifier s'il n'existe pas d'autres plages de DS des CMA à des valeurs supérieures à 1,8 qui présenteraient des propriétés intéressantes de libération contrôlée.

L'analyse globale de ces résultats obtenus au cours de ces deux premières études ainsi que de résultats supplémentaires subséquentement obtenus (figures A. 5 et A. 7) a également mis en évidence le rôle des propriétés structurales des CMA et même des amidons non substitués sur leurs propriétés de contrôle de la libération des médicaments. Afin de contrôler la libération du PA, la structure des chaînes de CMA devait correspondre à un patron de type-V et non pas à un patron de type-B tel que l'amidon natif (Hylon VII). Lors de la synthèse aqueuse, ce type de structure était induit par la substitution des groupes OH par des groupes

CM au-delà d'une valeur minimale de 0,14. Lors de la synthèse diphasique en milieu organique, ce changement de polymorphisme était induit par l'action du NaOH sur les groupes hydroxyles des chaînes d'amidon. Pour cette deuxième méthode de synthèse, un DS minimal de 0,1 a également été recommandé, mais cette valeur de DS était liée à la valeur limite pour assurer l'hydratation uniforme de la matrice plutôt qu'à la capacité de contrôle de la libération du PA. Ces différents mécanismes de changement de polymorphisme des CMA induits par les deux méthodes de synthèse ont eu pour conséquence d'obtenir deux amidons non substitués (HAS-0 et HAS-0_{NaOH}), agissant comme témoin, qui possédaient des structures différentes et des propriétés de contrôle de la libération du PA totalement opposées. Par traitement en phase aqueuse, la structure du HAS-0 correspondait au patron de type-B et agissait tel un désintégrant, tandis que la structure du HAS-0_{NaOH} obtenu par synthèse en milieu organique, qui présentait de bonnes propriétés de libération soutenue, correspondait au patron de type-V. En fait, les propriétés de libération soutenue des HAS-0_{NaOH} étaient supérieures à la majorité des CMA si ne l'on prend pas en considération l'hydratation non uniforme de la matrice. Devant ces résultats, il est recommandé, lors des futures études sur les CMA, d'utiliser comme témoin un amidon non substitué possédant également des propriétés de libération contrôlée tel que celui obtenu par synthèse en milieu organique ou un amidon pré-gélatinisé disponible commercialement.

À la suite de ces études qui utilisaient les CMA comme excipient pour l'élaboration de comprimés monolithiques, il a été vérifié si les CMA étaient un excipient intéressant pour l'élaboration de microsphères mucoadhésives. Toutefois, au préalable à cette vérification, deux étapes préparatoires ont été réalisées afin de pouvoir répondre aux objectifs de ladite vérification.

La première étape préparatoire a été de développer un modèle de barrière épithéliale gastrique pour évaluer la perméabilité gastrique des PA sous des conditions reproduisant celles existantes dans l'estomac humain. Cette étape était nécessaire, puisqu'un tel modèle était inexistant. Pour ce faire, la lignée cellulaire NCI-N87 a été utilisée. Il a été trouvé que les conditions de cultures optimales qui permettaient aux cellules NCI-N87 de se différencier en une barrière épithéliale gastrique typique correspondaient à une densité d'ensemencement

de $2,5 \times 10^5$ cellules/cm² sur des filtres de PET et maintenues dans un milieu composé de RPMI-1640 enrichi de sérum jusqu'à 18 à 27 jours postconfluence. Les monocouches de cellules ainsi produites présentaient une RETE modérément élevée d'environ 500 Ω cm², des cellules possédant une morphologie polygonale qui exprimaient les protéines E-cadhérine et ZO-1 à leur surface de contact et qui produisaient des agglomérats de mucus à leur surface. Ces monocouches de cellules NCI-N87 étaient capables de supporter une variation de pH de 7,4 à 3,0 du côté apical lorsque le pH du côté basolatéral était fixé à 7,4. Sous ces différents gradients de pH, les P_{app} des trois composés modèles ont été évaluées. Il a été trouvé que les monocouches de cellule étaient imperméables au marqueur d'intégrité LY (faible P_{app} de $0,3-1,1 \times 10^{-6}$ cm/s), que les P_{app} de la furosémide étaient faiblement dépendantes du pH, mais demeuraient modérées ($0,4-1,5 \times 10^{-5}$ cm/s) et que les P_{app} de la caféine étaient les plus élevées ($4,2-5,0 \times 10^{-5}$ cm/s) et insensibles aux variations de pH. Ces résultats montrent que la lignée cellulaire NCI-N87 permet d'obtenir un modèle *in vitro* utile pour évaluer la perméabilité et l'absorption gastriques des PA sous les conditions physiologiques se retrouvant dans l'estomac humain. Il est souhaité de poursuivre la caractérisation de cette lignée au niveau des mécanismes de transport actif des PA (s'ils existent) ainsi qu'au niveau de l'établissement d'une échelle de perméabilité des PA en corrélation avec les données d'absorption *in vivo* des PA. L'établissement d'une telle corrélation renforcerait fortement l'utilité de ce modèle.

La seconde étape réalisée au préalable de l'étude sur les CMA comme excipient pour la production de microsphères a été de déterminer quelle méthode permettrait de produire lesdites microsphères ainsi que l'optimisation de cette méthode de production (section 4.5.2). Il a été déterminé que seule la méthode d'émulsion-réticulation dans une phase huileuse composée d'un mélange de cyclohexane et de chloroforme à 80/20 %v/v permettait de produire des MS-CMA possédant les propriétés appropriées pour leur administration orale. Lors de l'optimisation de cette méthode, il a été trouvé que la concentration de surfactant gouvernait la granulométrie et la morphologie des MS-CMA, où l'augmentation de la concentration de surfactant de 0 à 1,0% diminuait le diamètre moyen des MS-CMA d'environ 290 à 15 μ m. L'augmentation de la vitesse d'agitation diminuait légèrement le diamètre moyen des CMA. En fonction de ces influences, une concentration de surfactant de

0,1% et une vitesse d'agitation de 600 rpm ont été sélectionnées pour produire les MS-CMA. Étant donné les faibles limites de cyclohexane, de chloroforme et de 2-propanol (servant au séchage et au nettoyage des microsphères) résiduelles admises dans les formes pharmaceutiques pour leur administration chez l'humain (ICH, 2011), il est recommandé de poursuivre le développement de cette méthode de production des MS-CMA afin de réduire au minimum ou idéalement éliminer l'utilisation de ces solvants dans le procédé.

Cette méthode de production des microsphères par émulsion-réticulation a été utilisée pour produire des microsphères chargées ou non avec de la furosémide (PA modèle) à partir des poudres de CMA synthétisés en milieu organique avec des DS variant de 0,1 à 1,5. L'objectif spécifique visé par cette étude était d'étudier l'influence du DS sur les propriétés physico-chimiques, de libération de médicaments et de mucoadhésion des microsphères ainsi que sur les interactions des microsphères avec des modèles de barrières épithéliales du TGI. Toutes les MS-CMA qui ont été produites étaient amorphes et sphériques avec un $D_{3,2}$ d'environ 90 μm et une étroite distribution de taille (de 45 à 145 μm). Ces propriétés ainsi que l'efficacité de chargement ($\approx 50\%$) et la densité ($\approx 1,5 \text{ g/cm}^3$) étaient fonction des paramètres de production. La valeur du DS avait une influence significative sur la reprise d'eau à l'équilibre et sur les propriétés de libération du PA des MS-CMA par la modulation des forces attractives et répulsives entre les chaînes de CMA physiquement reliées. Dans le HBSS à un pH de 1,0, la reprise de media à l'équilibre était faible et augmentait légèrement avec l'augmentation du DS jusqu'à environ 27 w/w pour un DS de 1,5. Le temps nécessaire à la libération de 90% de la furosémide augmentait continuellement avec l'augmentation du DS pour atteindre une valeur maximale de 1 h avec un DS de 1,5. Cette augmentation de temps avec l'augmentation du DS résultait probablement de l'augmentation de la somme des forces associatives (ponts hydrogènes) entre les chaînes de CMA induites par l'accroissement du nombre de groupes carboxyliques. De plus, il a été trouvé que le chargement de la furosémide à l'intérieur des MS-CMA augmentait de façon importante sa solubilité en milieu acide d'une valeur initiale de 6 $\mu\text{g/mL}$ à une valeur de 28 $\mu\text{g/mL}$, où cette augmentation de solubilité résultait d'un changement de polymorphisme de la furosémide d'une structure initialement cristalline à une structure amorphe suite à son chargement dans les microsphères. Dans le HBSS à un pH de 7,4, la reprise de media à l'équilibre des MS-CMA était beaucoup plus

élevée et augmentait avec l'élévation du DS (jusqu'à 74 w/w pour un DS de 1,5) et était influencée par le chargement de la furosémide tandis que la dissolution de la furosémide était très rapide peu importe la valeur du DS ($T_{90\%} < 0,1$ h) probablement dû à l'augmentation de la somme des forces répulsives induites par l'accroissement du nombre de groupes carboxylates sur les chaînes de CMA ainsi que des molécules de furosémide dissociées chargées négativement.

La caractérisation des interactions des MS-CMA avec des modèles cellulaires de barrières épithéliales du TGI a montré que l'organisation de la structure des jonctions serrées des monocouches de cellules gastriques NCI-N87 n'était pas influencée par la présence des MS-CMA. À l'opposé, la RETE des monocouches de cellules intestinales Caco-2 en contact avec les microsphères diminuait avec l'augmentation du DS des MS-CMA ce qui indiquait que les mécanismes d'ouverture des jonctions serrées étaient très probablement induits par l'appauvrissement du Ca^{2+} extracellulaire nécessaire au maintien de l'échafaudage des protéines des jonctions serrées par les MS-CMA. L'ouverture des jonctions serrées des monocouches de cellules Caco-2 avec l'augmentation du DS des MS-CMA augmentait les taux de perméation de la furosémide libérée à partir des microsphères au travers des monocouches de cellules jusqu'à un taux 9,1 fois plus élevé avec un DS de 1,5 que celui de la furosémide simplement dissoute dans le milieu de transport. Au travers des monocouches de cellules NCI-N87, les taux de perméation de la furosémide libérée à partir des microsphères augmentaient également dû à une plus grande concentration de furosémide à la surface des monocouches de cellules à tous les pH, mais cette augmentation était plus faible, soit environ 1,5 à 1,75 fois à celle de la furosémide dissoute dans le milieu de transport. Les MS-CMA, peu importe le DS, n'étaient pas cytotoxiques pour les cellules NCI-N87 et Caco-2 jusqu'à une concentration de 10 mg/mL.

Il a été trouvé que le DS influençait significativement la mucoadhésion des MS-CMA à la surface de muqueuses du TGI, mais où, dans ce cas particulier, l'augmentation du DS avait des effets opposés en fonction de la nature des muqueuses. À la surface des muqueuses gastriques maintenues sous des conditions acides, la mucoadhésivité des microsphères augmentait avec le DS des MS-CMA jusqu'à une valeur de DS de 1,0 (mucoadhésion

supérieure à 55% après 5 h), ce qui résultait probablement d'un plus grand nombre de ponts hydrogènes entre les groupes carboxyliques et les mucines de la muqueuse gastrique. Toutefois, un niveau de stabilisation et d'affinité plus élevé entre les chaînes de polymère ou la conformation spatiale induite par la dimérisation des groupes carboxyliques pour les MS-CMA avec un DS de 1,5 a réduit significativement la mucoadhésivité des microsphères. À la surface de muqueuses intestinales maintenues sous des conditions de pH neutre, les MS-CMA, peu importe la valeur du DS, ne possédaient aucune propriété mucoadhésive où des valeurs de mucoadhésion inférieures à 10% ont été mesurées probablement dû aux forces répulsives entre les groupes carboxylates et les mucines chargées négativement ainsi qu'à la forte reprise d'eau à l'équilibre des MS-CMA dans les milieux neutres.

L'ensemble de ces résultats a montré que les MS-CMA avec des DS entre 0,6 et 1,0 possédaient des propriétés appropriées et prometteuses pour leur utilisation en tant que forme pharmaceutique mucoadhésive gastro-rétentive qui permettrait de contrôler l'administration orale de petites molécules actives pour une action thérapeutique systémique ou localisée. De plus, ces résultats, particulièrement la très faible cytotoxicité des MS-CMA, indiquent les CMA comme un excipient avantageux pour l'élaboration de microsphères mucoadhésives. En effet, bien que la densité des MS-CMA obtenues lors de cette étude était inférieure à la valeur de $2,5 \text{ g/cm}^3$ nécessaire pour prolonger significativement le temps de résidence des microsphères dans l'estomac (Bardonnet *et al.*, 2006), le couplage des propriétés mucoadhésives, d'augmentation de la perméabilité du PA au travers de la barrière épithéliale gastrique et l'obtention de formulation amorphe semble être prometteur pour le développement de formes pharmaceutiques gastro-rétentives avec les CMA. Le très faible potentiel cytotoxique des MS-CMA tend également à suggérer que les CMA pourraient être comme excipient pour la vectorisation de macromolécules actives (par exemple peptides, protéines) au moyen de nanosphères ou de nanocapsules, mais dans ce cas pour un ciblage entérique.

Pour les mêmes raisons précédemment mentionnées ainsi que pour la capacité des MS-CMA à ouvrir de façon réversible les jonctions serrées de monocouches de cellules Caco-2 sous des conditions neutres, il est également permis d'entrevoir le potentiel d'utilisation des CMA

pour l'élaboration de formes pharmaceutiques (micro- et nanosphères et micro- et nanocapsules) mucoadhésives pour l'administration des PA par voie aérienne (nasale ou pulmonaire). Il est envisageable que la mucoadhésivité des formulations à base de CMA à la surface des muqueuses nasales et pulmonaires serait supérieure à celle à la surface des muqueuses intestinales étant donné la nature propre des voies respiratoires qui permettraient aux formulations d'adhérer à la surface des muqueuses au moyen d'un mécanisme d'hydratation. Toutefois, avant d'envisager d'autres applications pour les MS-CMA, il est recommandé, pour des raisons économiques, d'optimiser la méthode de production par émulsion-réticulation utilisée afin d'augmenter l'efficacité de chargement des PA à l'intérieur des microsphères et d'obtenir la taille de particules optimales. Cette optimisation pourrait être également réalisée lors du développement d'une méthode de production sans solvant organique tel que souhaité précédemment et en utilisant un PA modèle qui posséderait des propriétés plus appropriées que la furosémide pour ce mode de production.

L'analyse comparative des courbes de dissolution obtenues pour les comprimés monolithiques et les microsphères sous des conditions acides a montré que la réticulation des chaînes de CMA avait une influence sur les propriétés de contrôle de la libération des médicaments des formes pharmaceutiques à base de CMA. Pour les CMA non réticulés (comprimés monolithiques), les $T_{90\%}$ variaient non linéairement avec l'augmentation du DS dû à la modification de l'équilibre entre les forces attractives dans la couche de gel et la solubilité relative des CMA en milieu acide. Pour les CMA réticulés (microsphères), la liaison physique des chaînes de CMA par le STMP avait pour conséquence de rendre les matrices de CMA insolubles en milieu acide. Cette insolubilité permettait donc à la somme des forces attractives entre les chaînes de CMA d'être le facteur principal qui contrôlait la libération du PA, où les $T_{90\%}$ augmentaient de façon directement proportionnelle avec l'augmentation du DS des MS-CMA. Il est à noter que pour ces deux formes pharmaceutiques, il existait des valeurs de DS qui permettaient d'obtenir une libération soutenue des PA dans le FGS significativement supérieure aux témoins non substitués gélatinisés (comprimés monolithiques) ou réticulés (microsphères).

Dans la perspective de la poursuite du développement des CMA comme excipient, il serait intéressant d'étudier l'influence de haut DS conjointement avec la réticulation des chaînes de

CMA sur les propriétés de contrôle de la libération de ces CMA formulés sous forme de comprimés monolithiques. Il est anticipé que les profils de dissolution de ces comprimés monolithiques reproduiront l'évolution linéaire des $T_{90\%}$ avec l'augmentation du DS tel qu'établi avec les MS-CMA. Toujours dans le but de poursuivre le développement des CMA comme excipient, il serait également intéressant de vérifier si les CMA avec des DS élevés, réticulés ou non, peuvent servir d'enrobage entérique pour des formulations pharmaceutiques solides « traditionnelles », ouvrant ainsi un autre champ d'application pour les CMA. Toutefois, au préalable de ces nouvelles applications des CMA, il est fortement suggéré de vérifier la stabilité à long terme des propriétés des CMA et des formulations actuelles à base de CMA.

À la lumière de l'ensemble des résultats obtenus et des analyses effectuées au cours de la réalisation de cette thèse, il est possible d'affirmer que le CMA sous forme sodique faiblement à hautement substitué, qu'il soit séché par PS ou SA, synthétisé en milieu aqueux ou par réaction diphasique en milieu organique, réticulé ou non, est un excipient multifonctionnel et prometteur pour l'élaboration de formes pharmaceutiques solides à administration orale à libération contrôlée. Les critères soutenant la multifonctionnalité du CMA sont : possède de multiples rôles à l'intérieur des formulations (excipient exclusif), permet l'élaboration de formulation au moyen de procédés simples (compression directe, émulsion-réticulation) et permet d'amélioration (potentielle) de l'efficacité thérapeutique de certains PA. La sélection de la valeur du DS des CMA devra être en fonction des propriétés fonctionnelles désirées pour un PA donné. Toutefois, de façon générale, les CMA à des faibles DS ($<0,25$) devraient être utilisés comme excipient pour l'élaboration de comprimés monolithiques à libération soutenue, où une faible sensibilité des taux de dissolution des PA au pH du milieu environnant est désirée. Les CMA avec des DS élevés devraient être utilisés comme excipient soit pour l'élaboration de comprimés monolithiques à libération retardée (DS de 0,9 à 1,2) ou pour l'élaboration de microsphères mucoadhésives gastro-rétentives (DS de 0,6 à 1,0) où une dissolution lente des PA dans le milieu gastrique ainsi qu'une grande mucoadhésivité sur la muqueuse gastrique sont désirés. Spécifiquement pour l'élaboration des microsphères mucoadhésives, l'emploi de la réticulation des chaînes de CMA est nécessaire pour assurer la structure physique desdites microsphères lors de leur

administration orale. L'utilisation d'un seul excipient à l'intérieur des formes pharmaceutiques avec lequel il est possible de modifier les propriétés de contrôle de la libération des PA ou de mucoadhésivité par, principalement, la modification de son DS ou en mélangeant différents DS, tel que le CMA présente un avantage considérable au point de vue de la minimisation des risques d'incompatibilité entre les excipients et les PA ainsi que de la simplification de la réalisation des études de compatibilité lors de l'étape de préformulation du PA. Finalement, dans l'optique d'assurer la plus grande robustesse possible des formulations à base de CMA et aux procédés utilisés pour les produire, les propriétés physico-chimiques (granulométrie, densité, morphologie et caractéristique de surface) des CMA devront être ajustées selon des critères de facilité de solubilisation, de dispersion, d'écoulement et de compressibilité lors ou à la suite de la synthèse des CMA à petite ou à grande échelle, à la condition que les CMA possèdent une structure correspondant à celle d'un patron de type-V ou amorphe. Idéalement, pour toutes les valeurs de DS, les CMA devraient posséder des propriétés similaires. Cette démarche devrait s'inscrire en parallèle avec des essais des formulations à base de CMA chez l'humain, ce qui permettrait de valider les résultats *in vitro* obtenus et de faciliter l'acceptation du CMA pour l'élaboration de formes pharmaceutiques solides à libération contrôlée à administration orale au sein de l'industrie pharmaceutique ainsi que par les instances de réglementation des médicaments.

Ce travail de recherche a permis d'améliorer les connaissances sur les CMA, la compréhension des dynamiques des formulations à base de CMA, de définir les limites d'utilisation des CMA et, dans une certaine mesure, d'améliorer les connaissances sur les formulations pharmaceutiques solides à administration orale. Il a également permis le développement d'un nouvel outil de caractérisation *in vitro* de la perméabilité gastrique des PA ainsi que des interactions des formes pharmaceutiques avec les barrières épithéliales gastriques. Ces contributions ouvrent la voie à de nombreuses directions de recherche afin de poursuivre le développement du CMA comme excipient multifonctionnel et l'établissement de la lignée cellulaire NCI-N87 comme modèle de la barrière épithéliale gastrique pour prédire l'absorption gastrique *in vivo* des PA et les propriétés des formes solides à administration orale à l'intérieur du TGI.

ANNEXE A

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Lors de la préparation des deux derniers articles constituant le corps de cette thèse, des expériences ont été exécutées dont les résultats n'ont pas été utilisés au cours de la rédaction desdits articles. Pour des fins de discussion et de référence, ces résultats supplémentaires, incluant la description des méthodes pour les obtenir, sont présentés dans cette annexe.

Annexe A.1 Résultats supplémentaires se rapportant à l'article intitulé « Lignée cellulaire NCI-N87 comme modèle de la barrière épithéliale gastrique pour l'étude de la perméabilité des médicaments »

Annexe A.1.1 NCI-N87 E-cadherin and Zonula Occludens-1 (ZO-1) evolution by SDS-PAGE and immunoblotting

NCI-N87 cells were cultivated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in complete Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI-1640) as described in section 7.2.6.1. Cells were seeded in 35 mm culture dishes (Corning Life Sciences, Corning, NY, USA) at a density of about 2.5×10^5 cells/cm² and cultured for up to 14 days post-confluency in complete RPMI-1640 renewed at every two days. Cells were washed with PBS, lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.6, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecylsulfate (SDS)) containing protease inhibitor cocktail I (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), and stored at -20°C until analysis. Protein concentration was estimated with a Micro BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Protein aliquots (20 µg) were loaded

onto 10% SDS-polyacrylamide gels, electrophoresed for 60 min at 150 V using a MiniProtean TetraCell system (BioRad, Hercules, CA, USA), and electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes for 30 min, at 100 V, using a Criterion Blotter apparatus (Biorad). Membranes were blocked 60 min in Tris buffer saline (TBS) containing 0.1% Tween-20 and 3% bovine serum albumin, and successively probed (60 min each time) with primary antibody (dilution 1/1000) and horseradish (HRP)-conjugated secondary antibody (dilution 1/10000). Antibody incubations and membrane washes were done in TBS containing 0.1% Tween-20. Immune complexes were revealed by incubation of membranes with ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore, ON, Canada) and exposition to HyBlot CLTM films (Denville Scientific, Toronto, ON, Canada). Primary antibodies were goat anti-human ZO-1 and rabbit anti-human E-cadherin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and secondary antibodies were rhodamine (TRITC)-conjugated donkey anti-goat IgG and fluorescein (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Membranes were reprobed with mouse monoclonal anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich) for normalization. Secondary antibodies, conjugated to HRP, were from Jackson ImmunoResearch.

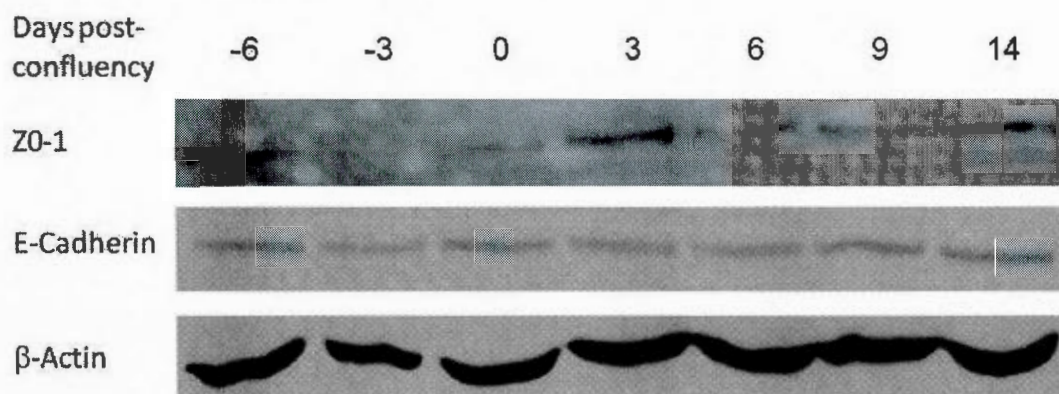


Figure A. 1 Immunoblots of E-cadherin, ZO-1 and β -Actin and from NCI-N87 cultures seeded at 2.5×10^5 cells/cm² and grown in complete RPMI-1640.

Annexe A.1.2 NCI-N87 and Caco-2 cell viability against various pH treatment

For comparison purpose, the verification of the cellular viability after various apical pH treatment was performed on both NCI-N87 and Caco-2 cell lines. NCI-N87 cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in complete Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI-1640) (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA) as described in section 7.2.6.1. Caco-2 were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in complete Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Hyclone Laboratories) as described in section 8.2.5.7. NCI-N87 and Caco-2 cells were respectively seeded on 96 well plates at density of about 2.5×10^5 and 3.5×10^4 cells/cm² and maintained until 14 days post-confluence. Cells were washed with the HBSS to be tested (described after) and incubated with 200 µL of this HBSS for 3 h, at 37 °C, into the orbital shaking incubator (100 rpm). The pH of the HBSS tested was adjusted with 25 mM HEPES (for pH 7.4 experiments), 15 mM 2(N-morpholino)ethane sulfonic acid (MES) (for pH 6.5 experiments), 20 mM acetate (for pH 5.0) and 1, 10 or 100 mM HCl (for pH 3.0, 2.0, 1.0 respectively). Two other 3 hours treatments were also evaluated as controls: incubation into pH 7.4 HBSS containing 1% of dimethyl sulfoxide (DMSO) and incubation into a pH 7.4 HBSS containing 1 µg/mL cytochalasin D (CD) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Cells were washed with pH 7.4 HBSS and analysed for viability 5 and 20 h post-treatment using a toxicology assay kit TOX2 (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. This assay measures reduction of the tetrazolium salt sodium XTT. Cells treated with pH 7.4 HBSS containing 2% sodium dodecyl sulfate were the 0% viability control.

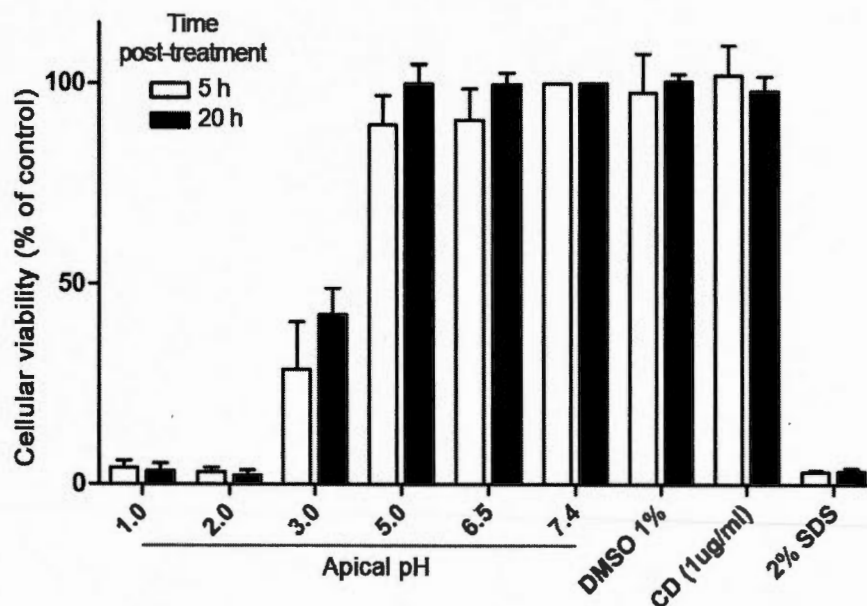


Figure A. 2 NCI-N87 cellular viability after 5 and 20 h in RPMI-1640 medium following the 3 h treatment with the different apical pH and controls. Results (means \pm SD of $n=3$, $m=8$) are expressed as % compare to cells treated with HBSS pH 7.4 (control).

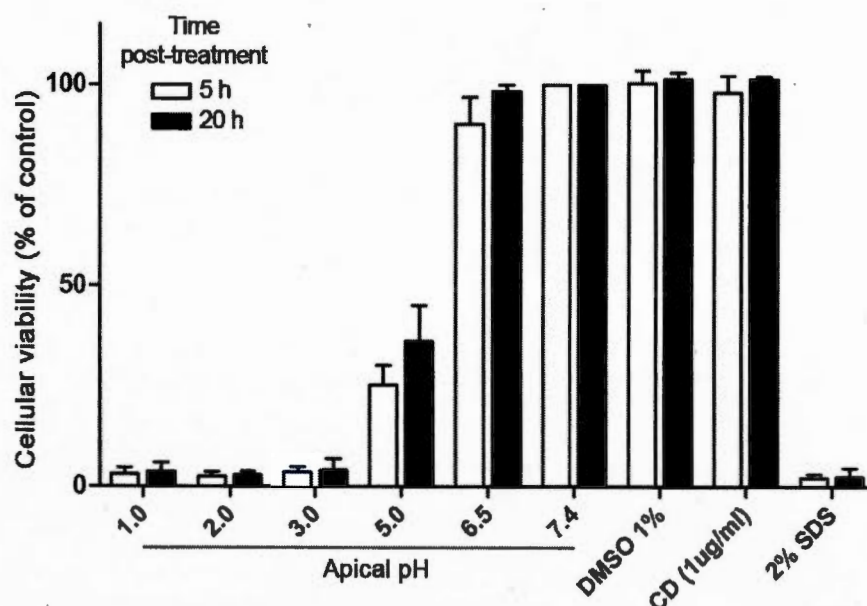


Figure A. 3 Caco-2 cellular viability after 5 and 20 h in DMEM medium following the 3 h treatment with the different apical pH and controls. Results (means \pm SD of $n=3$, $m=8$) are expressed as % compare to cells treated with HBSS pH 7.4 (control).

Annexe A.1.3 Effect of pH gradient on NCI-N87 monolayers TEER

Experiments were done as indicated in section 7.2.6.2 except that the 3 h treatment was done with an apical pH of 6.5 (HBSS with 15 mM MES) and to the exposition of the apical side to dimethyl sulfoxide (DMSO, 1% in pH 7.4 HBSS) and to cytochalasin D (CD, 1 $\mu\text{g/mL}$ in pH 7.4 HBSS).

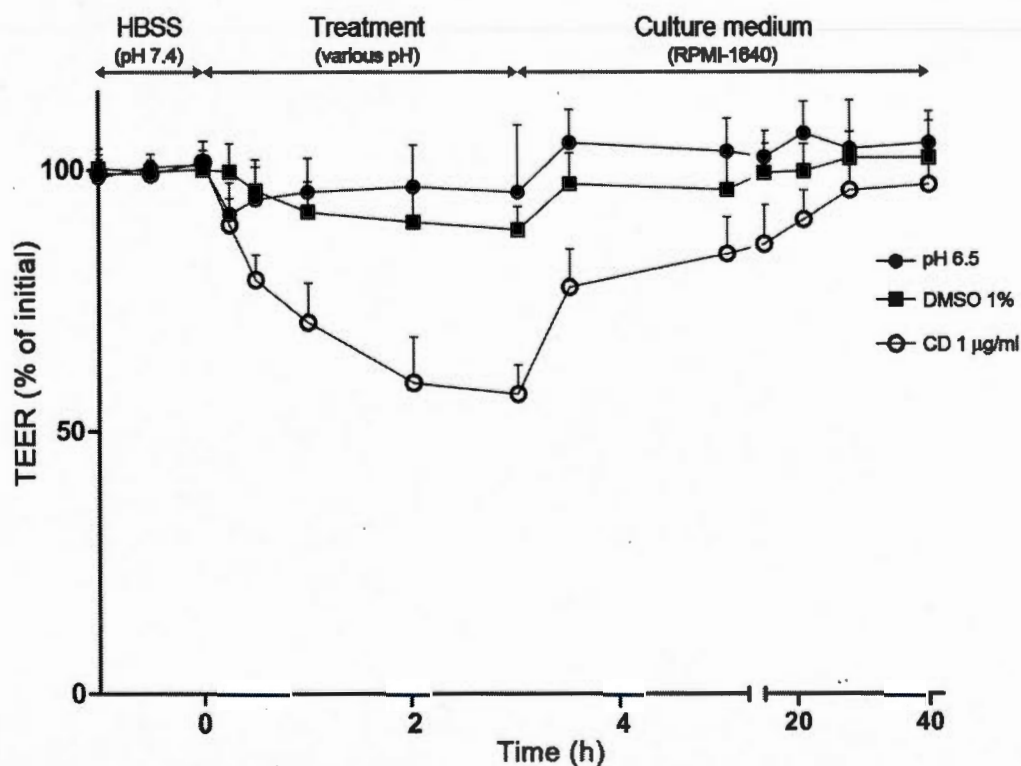


Figure A. 4 Effect of the apical pH on the TEER of NCI-N87 monolayers. Time course of TEER evolution in cultures pre-incubated for 1 h in pH 7.4 HBSS (apical and basolateral sides), treated for 3 h in HBSS with an apical pH of 6.5, and further grown for about 2 days in RPMI-1640 medium. Two treatments also involved the exposition of the apical side to dimethyl sulfoxide (DMSO, 1% in pH 7.4 HBSS) and to cytochalasin D (CD, 1 $\mu\text{g/mL}$ in pH 7.4 HBSS). The TEER measurements (means \pm SD for $n=3$, $m=3$) are expressed as % of initial values which averaged 512 ± 84 (SD) $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

Annexe A.2 Résultats supplémentaires se rapportant à l'article intitulé « Microsphères mucoadhésives de carboxyméthyl amidon : système gastro-rétentif d'administration de médicaments »

Annexe A.2.1 Carboxymethyl starch powder (CMS-P) and microspheres (CMS-MS) structural and thermal properties

Due to the high amount of materials produced and tested during this study, only X-ray diffractograms and DSC thermograms of representative degree of substitution of CMS-P and CMS-MS were presented in figure 8.3. Thus, this appendix presents the X-ray diffractograms and DSC thermograms of all the CMS-P and CMS-MS used during this study. The X-ray diffractograms and the DSC thermograms of the CMS-P and CMS-MS were obtained respectively as described in sections 8.2.5.5.1 and 8.2.5.5.2.

For figure A.9, X-ray diffraction patterns were obtained with a Bruker D2 PHASER (Munich, Germany) operating in reflectance mode at a Cu-K α wavelength (λ) of 1.540 Å, over an angular range 2θ from 5 to 35°, a scan rate of 5.75°/min and a samples rotating at 15 rpm.

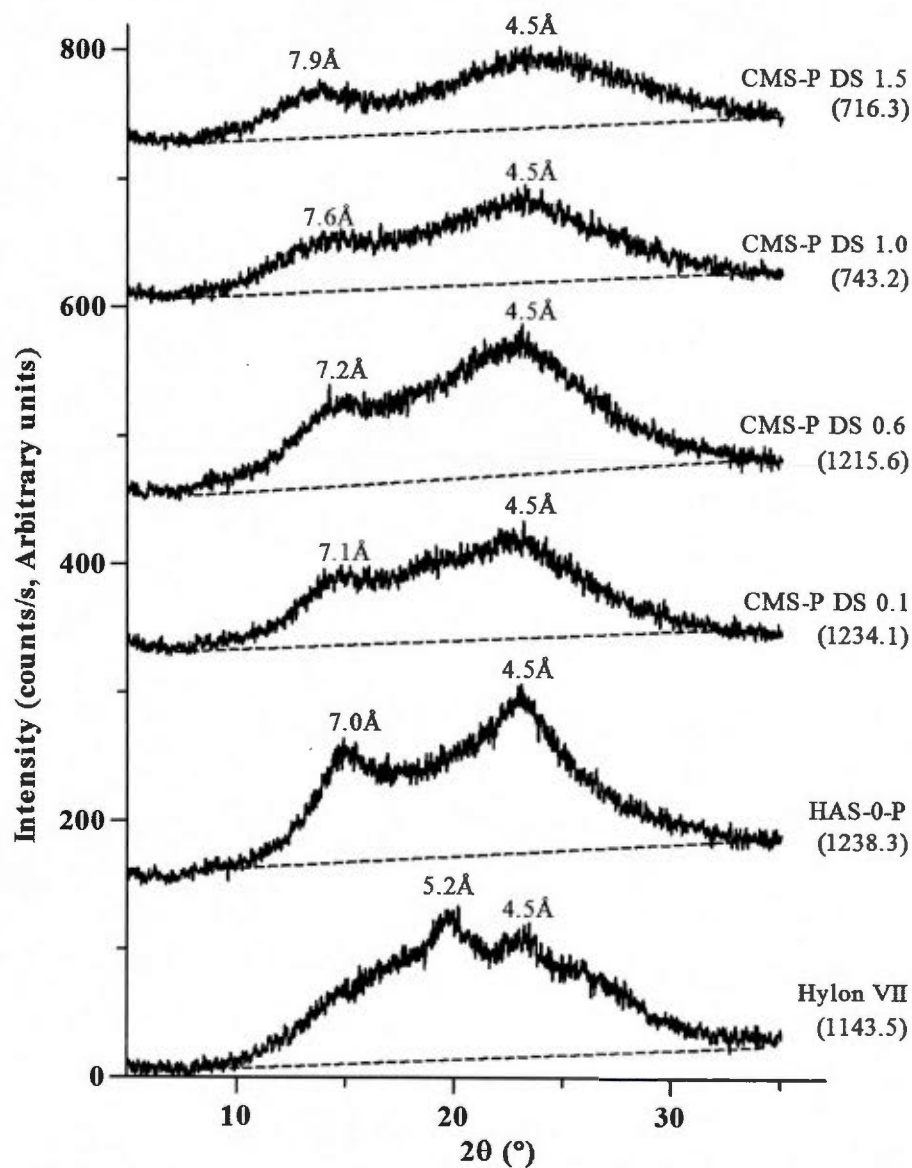


Figure A. 5 X-ray diffractograms of native starch (Hylon VII) and carboxymethyl starch powder (CMS-P) at various degree of substitution (DS) used to produce the carboxymethyl starch microspheres (CMS-MS). Value between bracket means area under the curve between 5 and 35° 2θ (A.U. $\cdot 2\theta$).

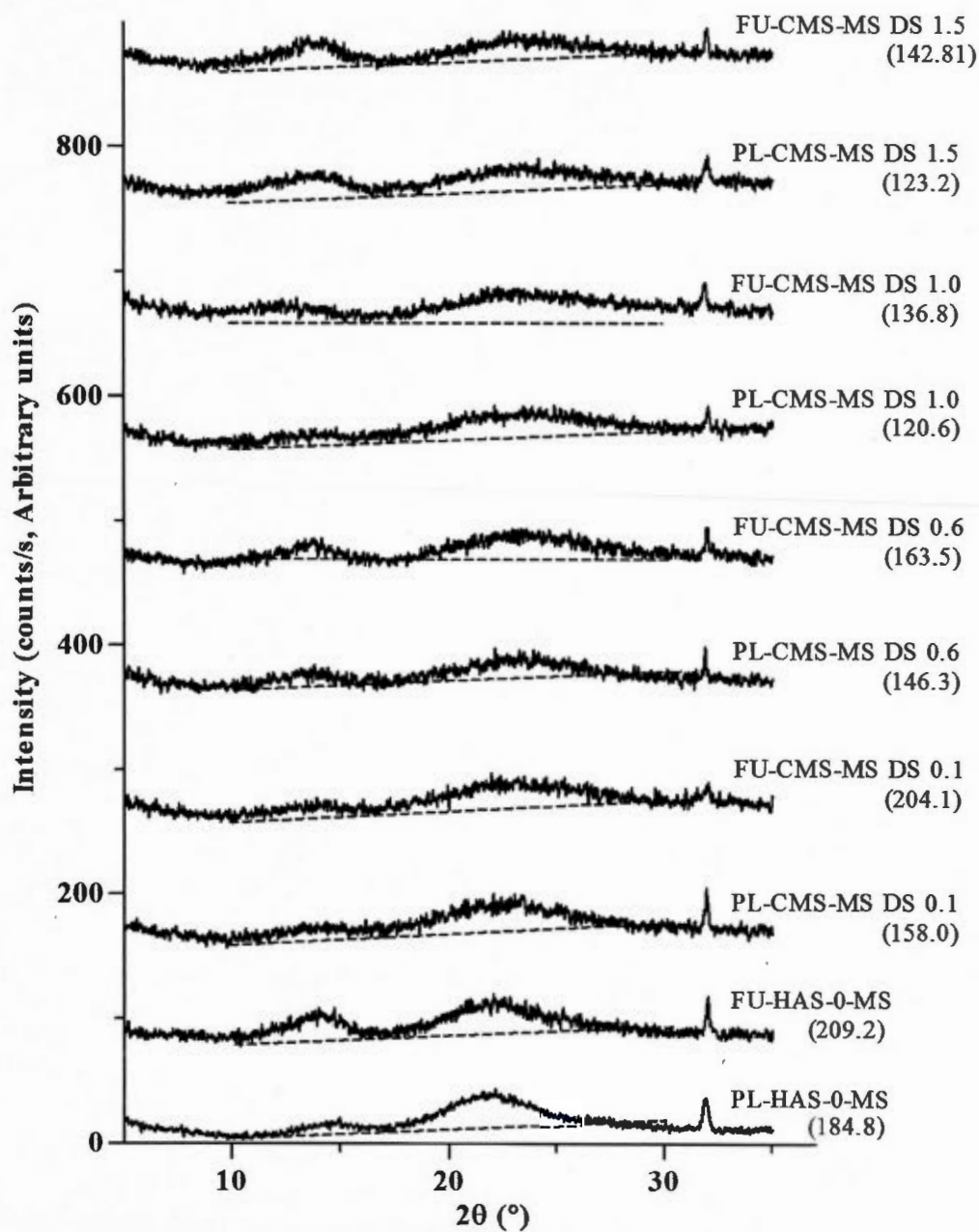


Figure A.6 X-ray diffractograms of carboxymethyl starch microspheres (CMS-MS) at various degree of substitution (DS). Value between bracket means area under the curve between 10 and 30° 2θ (A.U.·2 θ).

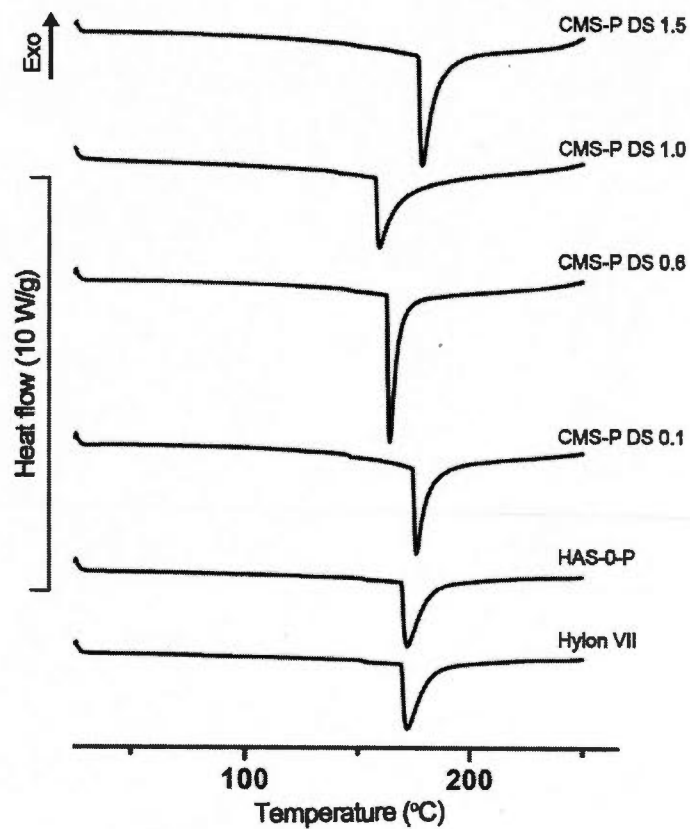


Figure A. 7 DSC thermograms of native starch (Hylon VII) and carboxymethyl starch powder (CMS-P) at various degree of substitution (DS) used to produce the carboxymethyl starch microspheres (CMS-MS).

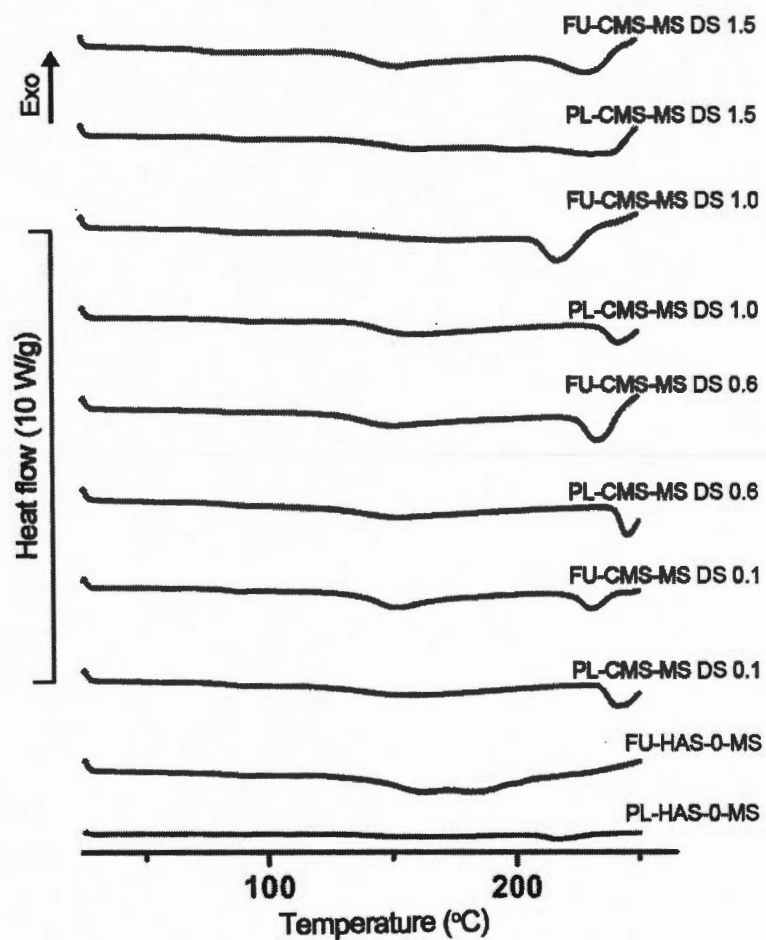


Figure A. 8 DSC thermograms of carboxymethyl starch microspheres (CMS-MS) at various degree of substitution (DS).

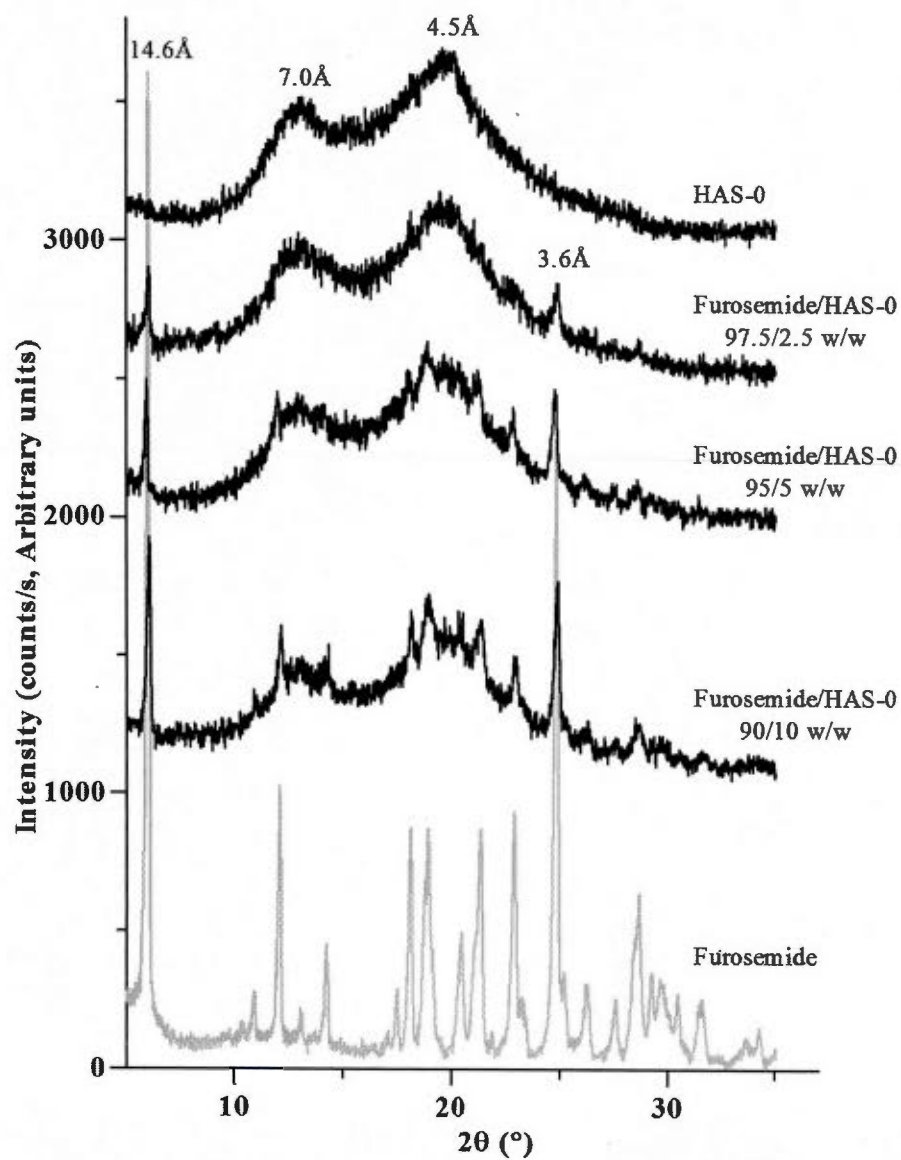


Figure A. 9 X-ray diffractograms of furosemide, HAS-0 and dry mixtures of furosemide and HAS-0 at various proportions.

RÉFÉRENCES

- Aceves, J. M., R. Cruz et E. Hernandez. 2000. «Preparation and characterization of Furosemide-Eudragit controlled release systems». *Int. J. Pharm.*, vol. 195, p. 45-53.
- Adolfsson, Å., H. Olsson et C. Nyström. 1997. «Effect of particle size and compaction load on interparticulate bonding structure for some pharmaceutical materials studied by compaction and strength characterisation in butanol». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 44, p. 243-251.
- Adson, A., T. J. Raub, P. S. Burton, C. L. Barsuhn, A. R. Hilgers, N. F. H. Ho et K. L. Audus. 1994. «Quantitative approaches to delineate paracellular diffusion in cultured epithelial cell monolayers». *J. Pharm. Sci.*, vol. 83, p. 1529-1536.
- Ahad, H. A., R. Sreenivasulu, E. M. Rani et B. V. Reddy. 2011. «Preparation and evaluation of famotidine high density gastro retentive microspheres with synthetic and natural polymers». *J. Pharm. Educ. Res.*, vol. 2, p. 54-60.
- Ahuja, A., R. K. Khar et J. Ali. 1997. «Mucoadhesive drug delivery systems». *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 23, p. 489 - 515.
- Allen, A., G. Flemstrom, A. Garner et E. Kivilaakso. 1993. «Gastroduodenal mucosal protection». *Physiol. Rev.*, vol. 73, p. 823-857.
- Allen, J. M., A. K. Wilson, P. L. Lucas et L. G. Curtis. 1997. «Carboxyalkyl cellulose esters». United States, US Patent 5668273.
- Amidon, G. E., et M. E. Houghton. 1995. «The Effect of moisture on the mechanical and powder flow properties of microcrystalline cellulose». *Pharm. Res.*, vol. 12, p. 923-929.
- Amidon, G. L., H. Lennernäs, V. P. Shah et J. R. Crison. 1995. «A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability». *Pharm. Res.*, vol. 12, p. 413-420.
- Andrews, G. P., T. P. Lavery et D. S. Jones. 2009. «Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 71, p. 505-518.
- Arshady, R. 1990. «Microspheres and microcapsules, a survey of manufacturing techniques: Part III: Solvent evaporation». *Polym. Eng. Sci.*, vol. 30, p. 915-924.

- Artursson, P., S. Neuhoﬀ, P. Matsson et S. Tavelin. 2007. «Passive permeability and active transport models for the prediction of oral absorption». In *Comprehensive medicinal chemistry II*, B. Taylor John et J. Trigg David, p. 259-278. Oxford: Elsevier.
- Asghar, L. F. A., et S. Chandran. 2006. «Multiparticulate formulation approach to colon specific drug delivery: Current perspectives». *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 9, p. 327-338.
- Assaad, E., et M. A. Mateescu. 2010. «The influence of protonation ratio on properties of carboxymethyl starch excipient at various substitution degrees: Structural insights and drug release kinetics». *Int. J. Pharm.*, vol. 394, p. 75-84.
- ATCC. 2007. «Product Information Sheet for CRL-5822», American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA.
- Atyabi, F., S. Manoochehri, S. Moghadam et R. Dinarvand. 2006. «Cross-linked starch microspheres: Effect of cross-linking condition on the microsphere characteristics». *Arch. Pharm. Res.*, vol. 29, p. 1179-1186.
- Balimane, P. V., et S. Chong. 2005. «Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique». *Drug Discovery Today*, vol. 10, p. 335-343.
- Balimane, P. V., Y.-H. Han et S. Chong. 2006. «Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction». *AAPS J.*, vol. 8, p. E1-E13.
- Ball, S. G., et M. K. Morell. 2003. «From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule». *Ann. Rev. Plant Biol.*, vol. 54, p. 207-223.
- Bardonnet, P. L., V. Faivre, W. J. Pugh, J. C. Piffaretti et F. Falson. 2006. «Gastroretentive dosage forms: Overview and special case of *Helicobacter pylori*». *J. Control. Release*, vol. 111, p. 1-18.
- Barich, D., E. Munson et M. Zell. 2005. «Physicochemical properties formulation, and drug delivery». In *Drug delivery principles and applications*, Binghe Wang, Teruna Siahaan et Richard Soltero, p. 57-72. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley and sons inc.
- Basit, A. W. 2005. «Advances in colonic drug delivery». *Drugs*, vol. 65, p. 1991-2007.
- Basque, J.-R., M. Chénard, P. Chailler et D. Ménard. 2001. «Gastric cancer cell lines as models to study human digestive functions». *J. Cell. Biochem.*, vol. 81, p. 241-251.
- Bernkop-Schnürch, A. 2005. «Mucoadhesive systems in oral drug delivery». *Drug Discov. Today: Technol.*, vol. 2, p. 83-87.

- Bertoft, E. 2004. «Analysing starch structure». In *Starch in food*, A.-C. Eliasson, p. 71-141. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Bhat, P. G., D. R. Flanagan et M. D. Donovan. 1995. «The limiting role of mucus in drug absorption: Drug permeation through mucus solution». *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 126, p. 179-187.
- , 1996. «Drug binding to gastric mucus glycoproteins». *Int. J. Pharm.*, vol. 134, p. 15-25.
- Björk, E., U. Isaksson, P. Edman et P. Artursson. 1995. «Starch microspheres induce pulsatile delivery of drugs and peptides across the epithelial barrier by reversible separation of the tight junctions». *J. Drug Target.*, vol. 2, p. 501-507.
- Blanchard, J. 1978. «Gastrointestinal absorption. II. Formulation factors affecting bioavailability». *Am. J. Pharm.*, vol. 150, p. 132-151.
- Bolhuis, G. K., H. V. Van Kamp et C. F. Lerk. 1986. «On the similarity of sodium starch glycolate from different sources». *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 12, p. 621-630.
- Bolhuis, G. K., H. V. Van Kamp, C. F. Lerk, J. W. Gielen, A. W. Arends et G. J. Stuit. 1984. «Effect of variation of degree of substitution, crosslinking and purity on the disintegration efficiency of sodium starch glycolate». *Acta Pharm. Technol.*, vol. 30, p. 24-32.
- Bos, C. E., G. K. Bolhuis, H. Van Doorne et C. F. Lerk. 1987. «Native starch in tablet formulations: properties on compaction». *Pharm. Weekbl. Sci. Ed.*, vol. 9, p. 274-282.
- Brittain, H. G. 2012. «Polymorphism and solvatomorphism 2010». *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, p. 464-484.
- Brittain, H. G., S. J. Bogdanowich, D. E. Bugay, J. DeVincentis, G. Lewen et A. W. Newman. 1991. «Physical characterization of pharmaceutical solids». *Pharm. Res.*, vol. 8, p. 963-973.
- Brouillet, F., B. Bataille et L. Cartilier. 2008. «High-amylose sodium carboxymethyl starch matrices for oral, sustained drug-release: formulation aspects and in vitro drug-release evaluation». *Int. J. Pharm.*, vol. 356, p. 52-60.
- Brouillet, F., G. Baylac, L. Cartilier et B. Bataille. 2010. «High-amylose sodium carboxymethyl starch matrices for oral, sustained drug release: development of a spray-drying manufacturing process». *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 36, p. 795-805.
- Buléon, A., P. Colonna, V. Planchot et S. Ball. 1998. «Starch granules: structure and biosynthesis». *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 23, p. 85-112.

- Calcagno, A. M., et T. J. Siahaan. 2005. «Physiological, biochemical and chemical barriers to oral drug delivery». In *Drug delivery principles and applications*, Binghe Wang, Teruna Siahaan et Richard Soltero, p. 15-28. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley and sons inc.
- Calinescu, C., et M. A. Mateescu. 2008. «Carboxymethyl high amylose starch: Chitosan self-stabilized matrix for probiotic colon delivery». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 70, p. 582-589.
- Calinescu, C., J. Mulhbach, E. Nadeau, J. M. Fairbrother et M. A. Mateescu. 2005. «Carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) as excipient for Escherichia coli oral formulations». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 60, p. 53-60.
- Calinescu, C., E. Nadeau, J. Mulhbach, J. M. Fairbrother et M. A. Mateescu. 2007. «Carboxymethyl high amylose starch for F4 fimbriae gastro-resistant oral formulation». *Int. J. Pharm.*, vol. 343, p. 18-25.
- Cao, Q.-R., Y.-W. Choi, J.-H. Cui et B.-J. Lee. 2005. «Formulation, release characteristics and bioavailability of novel monolithic hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets containing acetaminophen». *J. Control Release*, vol. 108, p. 351-361.
- Carr, R. L. 1965. «Classifying flow properties of solids». *Chem. Eng.*, vol. 72, p. 69-72.
- Castellano, I., I. Goni, M. Gurruchaga, M. V. Velasco, A. Munoz et M. R. Jimenez-Castellanos. 1997. «Contribution to the study of new graft copolymer matrices for drug delivery systems. Technological study». *Int. J. Pharm.*, vol. 146, p. 71-79.
- Castellano, I., M. Gurruchaga et I. Goni. 1997. «The influence of drying method on the physical properties of some graft copolymers for drug delivery systems». *Carbohydr. Polym.*, vol. 34, p. 83-89.
- Chailler, P., et D. Ménard. 2005. «Establishment of human gastric epithelial (HGE) cell lines exhibiting barrier function, progenitor, and prezytogenic characteristics». *J. Cell. Physiol.*, vol. 202, p. 263-274.
- Chan, A. B., C. N. Allen, N. L. Simmons, B. H. Hirst et M. E. Parsons. 1989. «Resistance to acid of canine kidney (MDCK) and human colonic (T84) and ileo-caecal (HCT-8) adeno-carcinoma epithelial cell monolayers in vitro». *Exp. Phys.*, vol. 74, p. 553-556.
- Chaudhari, A., K. R. Jadhav et V. J. Kadam. 2010. «An overview: microspheres as nasal drug delivery system». *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 5, p. 8-17.
- Chen, J., et J. Jane. 1994a. «Preparation of granular cold-water-soluble starches by alcoholic-alkaline treatment». *Cereal. Chem.*, vol. 71, p. 618-622.

- , 1994b. «Properties of granular cold-water-soluble starches prepared by alcoholic-alkaline treatments». *Cereal. Chem.*, vol. 71, p. 623-626.
- Chen, M. C., A. Chang, T. Buhl, M. Tanner et A. H. Soll. 1994. «Apical acidification induces paracellular injury in canine gastric mucosal monolayers». *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, vol. 267, p. G1012-G1020.
- Cherian, M., et E. Corona. 2006. «Lyophilisation of biologicals». In *Bioprocessing and biopartnering*, Saklatvala, p. 20-24. London, UK: Touch Briefings.
- Chien, Y. W. 1992. *Novel drug delivery systems*, second edition. New York, USA: Marcel Dekker, 816 p.
- Chien, Y. W., et S. Lin. 2007. «Drug delivery: controlled release». In *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, Third edition, James Swarbrick, p. 1082-1103. New York, NY, USA: Informa Healthcare USA.
- Chopra, S., G. V. Patil et S. K. Motwani. 2007. «Release modulating hydrophilic matrix systems of losartan potassium: Optimization of formulation using statistical experimental design». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 66, p. 73-82.
- Choudhury, P. K., et M. Kar. 2009. «Controlled release metformin hydrochloride microspheres of ethyl cellulose prepared by different methods and study on the polymer affected parameters». *J. Microencapsul.: Micro and Nano Carriers*, vol. 26, p. 46 - 53.
- Chowdary, K. P. R., et Y. Srinivasa Rao. 2004. «Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery». *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 27, p. 1717-1724.
- Chowdary, K. P. R., et Y. R. Srinivasa. 2003. Design and in vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microcapsules of glipizide for oral controlled release: A technical note. AAPS PharmSciTech.
- Colombo, P., R. Bettini, P. L. Catellani, P. Santi et N. A. Peppas. 1999. «Drug volume fraction profile in the gel phase and drug release kinetics in hydroxypropylmethyl cellulose matrices containing a soluble drug». *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 9, p. 33-40.
- Colombo, P., R. Bettini, P. Santi et N. A. Peppas. 2000. «Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance». *Pharm. Sci. Technol. Today*, vol. 3, p. 198-204.
- Colonna, P., et C. Mercier. 1985. «Gelatinization and melting of maize and pea starches with normal and high-amylose genotypes». *Phytochem.*, vol. 24, p. 1667-1674.

- Copinet, A., C. Bliard, J. P. Onteniente et Y. Couturier. 2001. «Enzymatic degradation and deacetylation of native and acetylated starch-based extruded blends». *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 71, p. 203-212.
- Cormack, D. H. 2001. *Essential histology*, Second edition. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Lippincott Williams & Wilkins p.
- Costa, P., et J. M. Sousa Lobo. 2001. «Modeling and comparison of dissolution profiles». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 13, p. 123-133.
- Crochet, P., T. Beauxis-Lagrange, T. R. Noel, R. Parker et S. G. Ring. 2005. «Starch crystal solubility and starch granule gelatinisation». *Carbohydr. Res.*, vol. 340, p. 107-113.
- Daniel, J. R., R. L. Whistler, H. Röper et B. Elvers. 2007. «Starch». In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 7th, M. Bohnet, G. Bellussi, J. Bus, B. Cornils, K. Drauz, H. Greim, W. A. Herrmann et K.-P. Jäckel, p. 1-25. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Daugherty, A. L., et R. J. Mersny. 1999a. «Regulation of the intestinal epithelial paracellular barrier». *Pharmaceutical Science & Technology Today*, vol. 2, p. 281-287.
- , 1999b. «Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier Part one». *Pharmaceutical Science & Technology Today*, vol. 2, p. 144-151.
- Davidovich-Pinhas, M., et H. Bianco-Peled. 2010. «Mucoadhesion: a review of characterization techniques». *Expert Opinion on Drug Deliv.*, vol. 7, p. 259-271.
- Davis, S. S. 2005. «Formulation strategies for absorption windows». *Drug Discov. Today*, vol. 10, p. 249-257.
- De Koninck, P., D. Archambault, F. Hamel, F. y. Sarhan et M. A. Mateescu. 2009. «Carboxymethyl-Starch excipients for gastrointestinal stable oral protein formulations containing protease inhibitors». *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 13, p. 78-92.
- Dehghan, M. G., et F. N. Khan. 2009. «Gastroretentive drug delivery systems: A patent perspective». *Int. J. Health Res.*, vol. 2, p. 23-44.
- Delie, F., et W. Rubas. 1997. «A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: Advantages and limitations of the Caco-2 model». *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.*, vol. 14, p. 66.
- Demirgoz, D., C. Elvira, J. F. Mano, A. M. Cunha, E. Piskin et R. L. Reis. 2000. «Chemical modification of starch based biodegradable polymeric blends: effects on water uptake, degradation behaviour and mechanical properties». *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 70, p. 161-170.

- Deorkar, N., et M. Baker. 2008. «High-Functionality excipients: a review». *Tablets and Capsules*, vol. 6, p. 23-26.
- Desai, D. H., K. C. Patel et R. D. Patel. 1976. «Thermal properties of amylose and its derivatives part I». *Starch - Stärke*, vol. 28, p. 377-381.
- Desai, K. G. 2005. «Preparation and characteristics of high-amylose corn starch/pectin blend microparticles: a technical note». *AAPS PharmSciTech.*, vol. 6, p. E202-E208.
- , 2007. «Properties of tableted high-amylose corn starch-pectin blend microparticles intended for controlled delivery of diclofenac sodium». *J. Biomater Appl.*, vol. 21, p. 217-233.
- Désévaux, C., P. Dubreuil, V. Lenaerts et C. Girard. 2002. «Tissue reaction and biodegradation of implanted cross-linked high amylose starch in rats». *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 63, p. 772-779.
- Dodou, D., P. Breedveld et P. A. Wieringa. 2005. «Mucoadhesives in the gastrointestinal tract: revisiting the literature for novel applications». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 60, p. 1-16.
- Dressman, J. B., R. R. Berardi, L. C. Dermentzoglou, T. L. Russell, S. P. Schmaltz, J. L. Barnett et K. M. Jarvenpaa. 1990. «Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women». *Pharm. Res.*, vol. 7, p. 756-761.
- Dressman, J. B., K. Thelen et E. Jantratic. 2008. «Towards quantitative prediction of oral drug absorption». *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 47, p. 655-667.
- Dumoulin, Y., S. Alex, P. Szabo, L. Cartilier et M. A. Mateescu. 1998. «Cross-linked amylose as matrix for drug controlled release. X-ray and FT-IR structural analysis». *Carbohydr. Polym.*, vol. 37, p. 361-370.
- Dumoulin, Y., L. H. Cartilier et M. A. Mateescu. 1999. «Cross-linked amylose tablets containing α -amylase: an enzymatically-controlled drug release system». *J. Control. Release*, vol. 60, p. 161-167.
- Dyas, A. M., et U. U. Shah. 2007. «Dissolution and dissolution testing». In *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, Third edition, James Swarbrick, p. 908-928. New York, NY, USA: Informa Healthcare USA.
- Erlander, S. R. 1998a. «Starch Biosynthesis. I. The size distributions of amylose and amylopectin and their relationships to the biosynthesis of starch». *Starch - Stärke*, vol. 50, p. 227-240.

- , 1998b. «Starch biosynthesis. II. The statistical model for amylopectin and its precursor plant glycogen». *Starch - Stärke*, vol. 50, p. 275-285.
- Eteng, M., E. Eyong, E. Akpanyung, M. Agiang et C. Aremu. 1997. «Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review». *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 51, p. 231-243.
- Fang, Y.-y., L.-j. Wang, D. Li, B.-z. Li, B. Bhandari, X. D. Chen et Z.-h. Mao. 2008. «Preparation of crosslinked starch microspheres and their drug loading and releasing properties». *Carbohydr. Polym.*, vol. 74, p. 379-384.
- Florence, A. T., et D. Attwood. 2006. *Physicochemical principles of pharmacy*, fourth edition. London, UK: Pharmaceutical Press, 513 p.
- Florence, A. T., et N. Hussain. 2001. «Transcytosis of nanoparticle and dendrimer delivery systems: evolving vistas». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 50, p. S69-S89.
- Fuhrer, C. 1996. «Interparticulate attraction mechanisms ». In *Pharmaceutical Powder Compaction Technology* G. Aldernborn et C. Nystrom, p. 1-15. New York: Marcel Dekker Inc.
- Gao, J., E. D. Hugger, M. S. Beck-Westermeyer et R. T. Borchardt. 2000. «Estimating intestinal mucosal permeation of compounds using Caco-2 cell monolayers». In *Current Protocols in Pharmacology*, S.J. Enna et Michael Williams, p. 7.2.1-7.2.23. New York: John Wiley and Sons.
- Garekani, H. A., J. L. Ford, M. H. Rubinstein et A. R. Rajabi-Siahboomi. 2001. «Effect of compression force, compression speed, and particle size on the compression properties of paracetamol». *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 27, p. 935 - 942.
- Goldring, J. 2008. «Novel excipients: The next pharmaceutical frontier?». *Am. Pharm. Rev.* En ligne. <<http://americanpharmaceuticalreview.com/ViewArticle.aspx?>>.
- Grassi, M. 2007. *Understanding drug release and absorption mechanisms. A physical and mathematical approach*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group p.
- Gupta, A., G. E. Peck, R. W. Miller et K. R. Morris. 2005. «Influence of ambient moisture on the compaction behavior of microcrystalline cellulose powder undergoing uni-axial compression and roller-compaction: A comparative study using near-infrared spectroscopy». *J. Pharm. Sci.*, vol. 94, p. 2301-2313.
- Gupta, P., K. Vermani et S. Garg. 2002. «Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery». *Drug Discovery Today*, vol. 7, p. 569-579.

- Hamdi, G., G. Ponchel et D. Duchene. 2001. «Formulation of epichlorohydrin cross-linked starch microspheres». *J. Microencapsul.*, vol. 18, p. 373-383.
- Han, C., et B. Wang. 2005. «Factors that impact the developability of drug candidates: an overview». In *Drug delivery : principles and applications* Binghe Wang, Teruna Siahaan et Richard Soltero, p. 1-14. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons.
- Han, R.-Y., J.-Y. Fang, K. C. Sung et O. Y. P. Hu. 1999. «Mucoadhesive buccal disks for novel nalbuphine prodrug controlled delivery: effect of formulation variables on drug release and mucoadhesive performance». *Int. J. Pharm.*, vol. 177, p. 201-209.
- Hancock, B. C., et M. Parks. 2000. «What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals?». *Pharm. Res.*, vol. 17, p. 397-404.
- Harding, S. E., S. S. Davis, M. P. Deacon et I. Fiebrig. 1999. «Biopolymer mucoadhesives». *Biotechnol. Genet. Eng.*, vol. 16, p. 41-86.
- Harikarnpakdee, S., V. Lipipun, N. Sutanthavibul et G. Ritthidej. 2006. «Spray-dried mucoadhesive microspheres: Preparation and transport through nasal cell monolayer». *AAPS PharmSciTech.*, vol. 7, p. E79-E88.
- Hausner, H. H. 1967. «Friction conditions in a mass of metal powders». *Int. J. Powder Metall.*, vol. 3, p. 7-13.
- Heb, C., B. Hartmann, M. D. Lechner, W. Nierling, C. Seidel et W.-M. Kulicke. 2007. «Influence of soluble polymer residues in crosslinked carboxymethyl starch on some physical properties of its hydrogels». *Starch - Stärke*, vol. 59, p. 423-429.
- Hebeish, A., M. I. Khalil et A. Hashem. 1990. «Carboxymethylation of starch and oxidized starches». *Starch - Stärke*, vol. 42, p. 185-191.
- Heinze, T., et A. Koschella. 2005. «Carboxymethyl ethers of cellulose and starch - A review». *Macromol. Symp.*, vol. 223, p. 13-40.
- Heinze, T., T. Liebert, U. Heinze et K. Schwikal. 2004. «Starch derivatives of high degree of functionalization 9: carboxymethyl starches». *Cellulose*, vol. 11, p. 239-245.
- Heinze, T., K. Pfeiffer et W. Lazik. 2001. «Starch derivatives with high degree of functionalization. III. Influence of reaction conditions and starting materials on molecular structure of carboxymethyl starch». *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 81, p. 2036-2044.
- Heinze, T., K. Pfeiffer, T. Liebert et U. Heinze. 1999. «Effective approaches for estimating the functionalization pattern of carboxymethyl starch of different origin». *Starch - Stärke*, vol. 51, p. 11-16.

- Heller, J. 1984. «Biodegradable polymers in controlled drug delivery.». *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.*, vol. 1, p. 39-90.
- Hidalgo, I. J., T. J. Raub et R. T. Borchardt. 1989. «Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability». *Gastroenterology*, vol. 96, p. 736-749.
- Hillery, A. M. 2001. «Drug delivery: the basic concepts». In *Drug delivery and targeting for pharmacists and pharmaceutical scientists*, A. M. Hillery, J. W. Lloyd et J. Swarbrick, p. 1-48. New York, New York, USA: Taylor and Francis.
- Hirsch, J. B., et J. L. Kokini. 2002. «Understanding the mechanism of cross-linking agents (POC13, STMP, and EPI) through swelling behavior and pasting properties of cross-linked waxy maize starches». *Cereal Chem.*, vol. 79, p. 102-107.
- Hofreiter, B. T. 1986. «Miscellaneous modifications». In *Modified Starches: properties and uses*, O. B. Wurzburg, p. 277. Florida: Boca Raton : CRC Press.
- Hogben, C. A. M., L. S. Schanker, D. J. Tocco et B. B. Brodie. 1957. «Absorption of drug from the stomach. II. The human ». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 120, p. 540-545.
- Hogben, C. A. M., D. J. Tocco, B. B. Brodie et L. S. Schanker. 1959. «On the mechanism of intestinal absorption of drugs». *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 125, p. 275-282.
- Huang, X., et C. S. Brazel. 2001. «On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems». *J. Control Release*, vol. 73, p. 121-136.
- Huang, Y., H. Yu et C. Xiao. 2007. «pH-sensitive cationic guar gum/poly (acrylic acid) polyelectrolyte hydrogels: Swelling and in vitro drug release». *Carbohydr. Polym.*, vol. 69, p. 774-783.
- Hubatsch, I., E. G. E. Ragnarsson et P. Artursson. 2007. «Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers». *Nat. Protoc.*, vol. 2, p. 2111-2119.
- Humphreys, W. G. 2005. «Presystemic and first-pass metabolism». In *Drug delivery principles and applications*, Binghe Wang, Teruna Siahaan et Richard Soltero, p. 83-102. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley and sons inc.
- ICH. 2011. *Impurities: Guideline for residual solvents Q3C(R5)*, International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, en ligne <http://www.ich.org/fileadmin/Q3C_R5_Step4.pdf>, Consulté le 22 mars 2011.

- IMS Health. 2010. *Top 20 global products, December 2010, IMS Health Midas, Danbury, CT en ligne* <[<http://imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/StaticFile/>](http://imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/StaticFile/)>, Consulté le 30 janvier 2011.
- Ingram, J. T., et W. Lowenthal. 1966. «Mechanism of action of starch as a tablet disintegrant I: Factors that affect the swelling of starch grains at 37°». *J. Pharm. Sci.*, vol. 55, p. 614-617.
- Ispas-Szabo, P., P. De Koninck, C. Calinescu et M. A. Mateescu. 2007. *Novel carboxymethyl starch excipients for oral dosage forms: Transaction of the 34th Annual meeting and exposition of the Controlled Release Society* (Long Beach, California). Controlled Release Society (CRS)
- Ispas-Szabo, P., F. Ravenelle, I. Hassan, M. Preda et M. A. Mateescu. 1999. «Structure-properties relationship in cross-linked high-amylose starch for use in controlled drug release». *Carbohydr. Res.*, vol. 323, p. 163-175.
- Jain, S. K., et M. S. Jangdey. 2008. «Lectin conjugated gastroretentive multiparticulate delivery system of clarithromycin for the effective treatment of *Helicobacter pylori*». *Molecular Pharmaceutics*, vol. 6, p. 295-304.
- Jamzad, S., L. Tutunji et R. Fassihi. 2005. «Analysis of macromolecular changes and drug release from hydrophilic matrix systems». *Int. J. Pharm.*, vol. 292, p. 75-85.
- Jane, J.-L. 1993. «Mechanism of starch gelatinization in neutral salt solutions». *Starch - Stärke*, vol. 45, p. 161-166.
- Jeon, Y.-J., et S.-K. Kim. 2000. «Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity». *Carbohydr. Polym.*, vol. 41, p. 133-141.
- Jha, A. K., et A. Bhattacharya. 2008. «Preparation and *in vitro* evaluation of sweet potato starch blended sodium alginate microbeads». *Adv. in Nat. Appl. Sci.*, vol. 2, p. 122-128.
- Jivraj, M., L. G. Martini et C. M. Thomson. 2000. «An overview of the different excipients useful for the direct compression of tablets». *Pharmaceutical Science & Technology Today*, vol. 3, p. 58-63.
- Jung, Y. J., K. L. Lee, B. K. Kim, J. W. Kim, J. B. Jeong, S. G. Kim, J. S. Kim, H. C. Jung et I. S. Song. 2006. «Usefulness of NCI-N87 cell lines in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa model». *Korean J. Gastroenterol.*, vol. 47, p. 357-362.
- Junginger, H. E., et J. C. Verhoef. 2007. «Drug delivery: mucoadhesive hydrogels». In *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, Third edition, James Swarbrick, p. 1169-1182. New York, NY, USA: Informa Healthcare USA.

- Kanjickal, D. G., et S. T. Lopina. 2004. «Modeling of drug release from polymeric delivery systems—A review». *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, vol. 21, p. 345-386.
- Kansy, M., F. Senner et K. Gubernator. 1998. «Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes». *J. Med. Chem.*, vol. 41, p. 1007-1010.
- Kararli, T. T. 1995. «Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals». *Biopharm. Drug Dispos.*, vol. 16, p. 351-380.
- Kaukonen, A. M., L. Laitinen, J. Salonen, J. Tuura, T. Heikkilä, T. Limnell, J. Hirvonen et V.-P. Lehto. 2007. «Enhanced in vitro permeation of furosemide loaded into thermally carbonized mesoporous silicon (TCPSi) microparticles». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 66, p. 348-356.
- Kavvada, K. M., J. G. Murray, V. A. Moore, A. G. A. Coombes et P. J. Hanson. 2005. «A collagen IV matrix is required for guinea pig gastric epithelial cell monolayers to provide an optimal model of the stomach surface for biopharmaceutical screening». *J. Biomol. Screen.*, vol. 10, p. 495-507.
- Khalil, M. I., A. Hashem et A. Hebeish. 1990. «Carboxymethylation of maize starch». *Starch - Starke*, vol. 42, p. 60-63.
- Khalil, M. I., A. Hashem et A. Hebeish. 1995. «Preparation and Characterization of Starch Acetate». *Starch - Starke*, vol. 47, p. 394-398.
- Khanvilkar, K., M. D. Donovan et D. R. Flanagan. 2001. «Drug transfer through mucus». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 48, p. 173-193.
- Khare, A. R., et N. A. Peppas. 1995. «Swelling/deswelling of anionic copolymer gels». *Biomaterials*, vol. 16, p. 559-567.
- Klausner, E. A., E. Lavy, D. Stepensky, E. Cserepes, M. Barta, M. Friedman et A. Hoffman. 2003. «Furosemide pharmacokinetics and pharmacodynamics following gastroretentive dosage form administration to healthy volunteers». *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 43, p. 711-720.
- Kokate, A., V. P. Marasanapalle, B. R. Jasti et X. Li. 2010. «Physiological and Biochemical Barriers to Drug Delivery». In *Oral controlled release formulation design and drug delivery*, Xiaoling Li et Bhaskara Jasti, p. 42-73. New York, New York, USA: McGraw-Hill.
- Konda, Y., et T. Chiba. 2002. «Rat gastric mucosal epithelial cell culture». In *Epithelial cell culture protocols*, p. 17-25.

- Kooijman, L. M., K. J. Ganzeveld, R. M. Manurung et H. J. Heeres. 2003. «Experimental studies on the carboxymethylation of arrowroot starch in isopropanol-water media». *Starch - Stärke*, vol. 55, p. 495-503.
- Korhonen, O., H. Kanerva, M. Vidgren, A. Urtti et J. Ketolainen. 2004. «Evaluation of novel starch acetate-diltiazem controlled release tablets in healthy human volunteers». *J. Control Release*, vol. 95, p. 515-520.
- Korhonen, O., S. Pohja, S. Peltonen, E. Suihko, M. Vidgren, P. Paronen et J. Ketolainen. 2002. «Effects of physical properties for starch acetate powders on tableting». *AAPS PharmSciTech*, vol. 3, p. 1-9.
- Korhonen, O., P. Raatikainen, P. Harjunen, J. Nakari, E. Suihko, S. Peltonen, M. Vidgren et P. Paronen. 2000. «Starch acetates - Multifunctional direct compression excipients». *Pharm. Res.*, vol. 17, p. 1138-1143.
- Koroskenyi, B., et S. P. McCarthy. 2002. «Microwave-assisted solvent-free or aqueous-based synthesis of biodegradable polymers». *J. Polym. Environ.*, vol. 10, p. 93-104.
- Kossmann, J., et J. Lloyd. 2000. «Understanding and influencing starch biochemistry». *Crit. Rev. Plant. Sci.*, vol. 19, p. 171-226.
- Kost, J., et S. Shefer. 1990. «Chemically-modified polysaccharides for enzymatically-controlled oral drug delivery». *Biomaterials*, vol. 11, p. 695-698.
- Kottke, M. K., H.-R. Chueh et C. T. Rhodes. 1992. «Comparison of Disintegrant and Binder Activity of Three Corn Starch Products». *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 18, p. 2207-2223.
- Kwon, K., J. H. Auh, J.-W. Kim, K. H. Park, C. H. Park et C. J. Ko. 1997. «Physicochemical Properties and Functionality of Highly Carboxymethylated Starch». *Starch - Stärke*, vol. 49, p. 499-505.
- Lai, L. N., A. A. Karim, M. H. Norziah et C. C. Seow. 2002. «Effects of Na₂CO₃ and NaOH on DSC thermal profiles of selected native cereal starches». *Food Chem.*, vol. 78, p. 355-362.
- Lai, L. N., A. A. Karim, M. H. Norziah et C. C. Seow. 2004. «Effects of Na₂CO₃ and NaOH on Pasting Properties of Selected Native Cereal Starches». *J. Food Sci.*, vol. 69, p. FCT249-FCT256.
- Lawal, O. S., M. D. Lechner, B. Hartmann et W.-M. Kulicke. 2007. «Carboxymethyl cocoyam starch: Synthesis, characterisation and influence of reaction parameters». *Starch - Stärke*, vol. 59, p. 224-233.

- Lawal, O. S., M. D. Lechner et W. M. Kulicke. 2008. «Single and multi-step carboxymethylation of water yam (*Dioscorea alata*) starch: Synthesis and characterization». *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 42, p. 429-435.
- Lazik, W., T. Heinze, K. Pfeiffer, G. Albrecht et P. Mischnick. 2002. «Starch derivatives of a high degree of functionalization. VI. Multistep carboxymethylation». *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 86, p. 743-752.
- Le Bail, P., F. G. Morin et R. H. Marchessault. 1999. «Characterization of a crosslinked high amylose starch excipient». *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 26, p. 193-200.
- Lee, P. I., et J.-X. Li. 2010. «Evolution of oral controlled release dosage forms». In *Oral controlled release formulation design and drug delivery*, H. Wen et K. Park, p. 21-31: John Wiley & Sons, Inc.
- Lee, V. H. L., et J. J. Yang. 2001. «Oral drug delivery». In *Drug delivery and targeting for pharmacists and pharmaceutical scientists*, A. M. Hillery, J. W. Lloyd et J. Swarbrick, p. 145-183. New York, New York, USA: Taylor and Francis.
- Lehr, C.-M., J. A. Bouwstra, J. f. J. Tukker et H. E. Junginger. 1990. «Intestinal transit of bioadhesive microspheres in an in situ loop in the rat—A comparative study with copolymers and blends based on poly(acrylic acid)». *Journal of Controlled Release*, vol. 13, p. 51-62.
- Lemieux, M., F. Bouchard, P. Gosselin, J. Paquin et M. A. Mateescu. 2011. «The NCI-N87 cell line as a gastric epithelial barrier model for drug permeability assay». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 412, p. 429-434.
- Lemieux, M., P. Gosselin et M. A. Mateescu. 2007. *Influence of drying method of carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS) derivatives on physical properties and drug release profiles.: 2007 AAPS Annual Meeting and Exposition* (San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA, 11-15 Novembre 2007). Résumé publié dans l'AAPS Journal, 2007, vol. 9(S2).
- , 2009. «Carboxymethyl high amylose starch as excipient for controlled drug release: Mechanistic study and the influence of degree of substitution». *Int. J. Pharm.*, vol. 382, p. 172-182.
- , 2010. «Influence of Drying Procedure and of Low Degree of Substitution on the Structural and Drug Release Properties of Carboxymethyl Starch». *AAPS PharmSciTech.*, vol. 11, p. 775-785.
- Lenaerts, V., Y. Dumoulin et A. M. Mateescu. 1991. «Controlled release of theophylline from cross-linked amylose tablets». *J. Control. Release*, vol. 15, p. 39-46.

- Lenaerts, V., I. Moussa, Y. Dumoulin, F. Mebsout, F. Chouinard, P. Szabo, M. A. Mateescu, L. Cartilier et R. Marchessault. 1998. «Cross-linked high amylose starch for controlled release of drugs: recent advances». *J. Controlled Release*, vol. 53, p. 225-234.
- Li, S., J. M. V. Mujiyambere et M. Liu. 2011. «Synthesis of carboxymethyl starch with high degree of substitution by a modified dry process». *Adv. Mater. Res.*, vol. 233-235, p. 306-310.
- Li, X., et B. Jasti. 2010. *Oral controlled release formulation design and drug delivery*. New York, New York, USA: McGraw-Hill, 452 p.
- Liechty, W. B., D. R. Kryscio, B. V. Slaughter et N. A. Peppas. 2010. «Polymers for Drug Delivery Systems». *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 1, p. 149-173.
- Lin, C.-C., et A. T. Metters. 2006. «Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 58, p. 1379-1408.
- Lowenthal, W., et J. H. Wood. 1973. «Mechanism of action of starch as a tablet disintegrant VI: Location and structure of starch in tablets». *J. Pharm. Sci.*, vol. 62, p. 287-293.
- Ma, N., L. Xu, Q. Wang, X. Zhang, W. Zhang, Y. Li, L. Jin et S. Li. 2008. «Development and evaluation of new sustained-release floating microspheres». *Int. J. Pharm.*, vol. 358, p. 82-90.
- MacAdam, A. 1993. «The effect of gastro-intestinal mucus on drug absorption». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 11, p. 201-220.
- Macheras, P., C. Reppas et J. B. Dressman. 1995. *Biopharmaceutics of orally administered drugs*. London, UK: Taylor and Francis p.
- Madara, J. L. 1998. «Regulation of the movement of solutes across tight junctions». *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 60, p. 143-159.
- Malafaya, P., F. Stappers et R. Reis. 2006. «Starch-based microspheres produced by emulsion crosslinking with a potential media dependent responsive behavior to be used as drug delivery carriers». *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, vol. 17, p. 371-377.
- Marieb, E. N. 1999. *Anatomie et physiologie humaines*, 2^e édition. St-Laurent, Qc, Canada: Editions du Renouveau Pédagogique Inc., 1194 p.
- Market research News. 2010. *Global modified starch derivatives markets a strategic review*, en ligne <<http://www.salisonline.org/market-research/global-modified-starch-derivatives-markets-a-strategic-review-aug-2010/>>, Consulté le 23 mars 2011.

- Marques, A. P., R. L. Reis et J. A. Hunt. 2002. «The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies». *Biomaterials*, vol. 23, p. 1471-1478.
- Martin, C., et A. M. Smith. 1995. «Starch biosynthesis». *Plant Cell*, vol. 7, p. 971-985.
- Martinez, M., et G. Amidon. 2002. «A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals». *J. Clin. Pharm.*, vol. 42, p. 620-643.
- Massicotte, L. P., W. E. Baille et M. A. Mateescu. 2008. «Carboxylated high amylose starch as pharmaceutical excipients: Structural insights and formulation of pancreatic enzymes». *Int. J. Pharm.*, vol. 356, p. 212-223.
- Mateescu, A. M., Y. Dumoulin et V. Lenaerts. 1994. «Cross-linked material for controlled release of biologically active compounds». Canada, Canadian Patent 2 041 774.
- , 1995. «Cross-linked material for controlled release of biologically active compounds». United States, US Patent 5 456 921.
- Maurer, H. W., et R. L. Kearney. 1998. «Opportunities and challenges for starch in the paper industry». *Starch - Stärke*, vol. 50, p. 396-402.
- Mitchell, G., et A. C. Wijnberg. 1995. «Standardization of methodology for chemical functions in starch derivatives. Part 1». *Starch - Stärke*, vol. 47, p. 46-50.
- Mitchell, G., et A. C. Wijnberg. 1997. «Standardization of methodology for chemical functions in starch derivatives. Part 2». *Starch - Stärke*, vol. 49, p. 485-488.
- Mitic, L. L., et J. M. Anderson. 1998. «Molecular architecture of tight junctions». *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 60, p. 121-142.
- Moës, A. J. 1993. «Gastroretentive dosage forms.». *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, vol. 10, p. 143-195.
- Moore, C. A. 1967. «An economic evaluation of starch use in the textile industry». In *Agriculture Economic Report, No. 109*, p. 1-35: U.S. Dept. of Agriculture, Economic Research Service.
- Moreton, C. 2010a. «Functionality and performance of excipients in a Quality-by-Design World: Part I. ». *Am. Pharm. Rev., Supp.*, vol. September/October 2010, p. 6-9.
- , 2010b. «Functionality and performance of excipients in a Quality-by-Design World: Part IX. New Excipients». *Am. Pharm. Rev., Supp.*, vol. September/October 2010, p. 40-43.

- , 2010c. «Functionality and performance of excipients in a Quality-by-Design World: Part VII. Quality risk management». *Am. Pharm. Rev., Supp.*, vol. September/October 2010, p. 32-35.
- Mortazavi, S. A. 1995. «An in vitro assessment of mucus/mucoadhesive interactions». *Int. J. Pharm.*, vol. 124, p. 173-182.
- Mortazavi, S. A., et J. D. Smart. 1995. «An investigation of some factors influencing the in vitro assessment of mucoadhesion». *Int. J. Pharm.*, vol. 116, p. 223-230.
- Mota, F. L., A. P. Carneiro, A. J. Queimada, S. P. Pinho et E. A. Macedo. 2009. «Temperature and solvent effects in the solubility of some pharmaceutical compounds: Measurements and modeling». *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 37, p. 499-507.
- Mrsny, R. J. 2005. «Modification of epithelial tight junction integrity to enhance transmucosal absorption». *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, vol. 22, p. 331-418.
- Mulhbach, J., P. Ispas-Szabo, V. Lenaerts et M. A. Mateescu. 2001. «Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings». *J. Control. Release*, vol. 76, p. 51-58.
- Mulhbach, J., P. Ispas-Szabo et M. A. Mateescu. 2004. «Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release: II. Swelling properties and mechanistic study». *Int. J. Pharm.*, vol. 278, p. 231-238.
- Mulhbach, J., P. Ispas-Szabo, M. Ouellet, S. Alex et M. A. Mateescu. 2006. «Mucoadhesive properties of cross-linked high amylose starch derivatives». *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 40, p. 9-14.
- Mulhbach, J., et M. A. Mateescu. 2005. «Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release: III. Diffusion properties». *Int. J. Pharm.*, vol. 297, p. 22-29.
- Mulhbach, J., M. A. Mateescu et C. Calinescu. 2005. «Composition contenant un matériau polymère et utilisations associées». Canada, Demande de brevet canadien 2 547 843.
- , 2008. «Composition comprising polymeric material and uses thereof». United States, US Patent Application 2008/0286253A1.
- Muzzio, F. J., T. Shinbrot et B. J. Glasser. 2002. «Powder technology in the pharmaceutical industry: the need to catch up fast». *Powder Technology*, vol. 124, p. 1-7.
- Nabais, T., F. Brouillet, S. Kyriacos, M. Mroueh, P. Amores da Silva, B. Bataille, C. Chebli et L. Cartilier. 2007. «High-amylose carboxymethyl starch matrices for oral sustained drug-release: In vitro and in vivo evaluation». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 65, p. 371-378.

- Nama, M., C. Gonugunta et R. V. Prabhakar. 2008. «Formulation and evaluation of gastroretentive dosage forms of clarithromycin». *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, p. 231-237.
- Narasimhan, B. 2001. «Mathematical models describing polymer dissolution: consequences for drug delivery». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 48, p. 195-210.
- Nelson, O., et D. Pan. 1995. «Starch synthesis in maize endosperms». *An. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.*, vol. 46, p. 475-496.
- Newman, A. W., R. L. Mueller, I. M. Vitez, C. C. Kiesnowski, D. E. Bugay, W. P. Findlay et C. Rodriguez. 1996. «Starch». In *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, G. Brittain Harry, p. 523-577: Academic Press.
- Nor Nadiha, M. Z., A. Fazilah, R. Bhat et A. A. Karim. 2010. «Comparative susceptibilities of sago, potato and corn starches to alkali treatment». *Food Chem.*, vol. 121, p. 1053-1059.
- Nystrom, C., et P.-G. Karehill. 1996. «The importance of intermolecular bonding forces and the concept of bounding surface area». In *Pharmaceutical powder compaction technology*, G. Aldernborn et C. Nyström, p. 17-54. New York: Marcel Dekker Inc.
- Obata, K., K. Sugano, M. Machida et Y. Aso. 2004. «Biopharmaceutics classification by high throughput solubility assay and PAMPA». *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 30, p. 181-185.
- Okayama, N., M. R. Fowler, S. R. Jennings, P. Patel, R. Specian, B. Alexander, T. H. Jackson, T. Oshima, K. Shannon et J. S. Alexander. 2000. «Characterization of JOK-1, a human gastric epithelial cell line». *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, vol. 36, p. 228-234.
- Omidian, H., et K. Park. 2010. «Oral targeted drug delivery systems: Gastric retention devices». In *Oral controlled release formulation design and drug delivery*, H. Wen et K. Park, p. 185-203: John Wiley & Sons, Inc.
- Ong, S., H. Liu et C. Pidgeon. 1996. «Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability». *J. Chromatogr. A*, vol. 728, p. 113-128.
- Onofre, F., Y.-J. Wang et A. Mauromoustakos. 2009. «Effects of structure and modification on sustained release properties of starches». *Carbohydr. Polym.*, vol. 76, p. 541-547.
- Onofre, F. O., et Y.-J. Wang. 2010. «Sustained release properties of crosslinked and substituted starches». *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 117, p. 1558-1565.

- Pade, V., et S. Stavchansky. 1998. «Link between drug absorption solubility and permeability measurements in Caco-2 cells». *J. Pharm. Sci.*, vol. 87, p. 1604-1607.
- Palumbo, P., U. Picchini, B. Beck, J. van Gelder, N. Delbar et A. DeGaetano. 2008. «A general approach to the apparent permeability index». *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, vol. 35, p. 235-248.
- Park, J.-G., H. Frucht, R. V. LaRocca, D. P. Bliss, Jr., Y. Kurita, T.-R. Chen, J. G. Henslee, J. B. Trepel, R. T. Jensen, B. E. Johnson, Y.-J. Bang, J.-P. Kim et A. F. Gazdar. 1990. «Characteristics of cell lines established from human gastric carcinoma». *Cancer Res.*, vol. 50, p. 2773-2780.
- Parvathy, K. S., N. S. Susheelamma, R. N. Tharanathan et A. K. Gaonkar. 2005. «A simple non-aqueous method for carboxymethylation of galactomannans». *Carbohydr. Polym.*, vol. 62, p. 137-141.
- Pawar, V. K., S. Kansal, G. Garg, R. Awasthi, D. Singodia et G. T. Kulkarni. 2011. «Gastroretentive dosage forms: A review with special emphasis on floating drug delivery systems». *Drug Delivery*, vol. 18, p. 97-110.
- Peppas, N. A., et J. J. Sahlin. 1989. «A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation». *Int. J. Pharm.*, vol. 57, p. 169-172.
- Peppas, N. A., J. B. Thomas et J. McGinty. 2009. «Molecular aspects of mucoadhesive carrier development for drug delivery and improved absorption». *J. Biomat. Sci.-Polym. E.*, vol. 20, p. 1-20.
- Pereswetoff-Morath, L. 1998. «Microspheres as nasal drug delivery systems». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 29, p. 185-194.
- Perioli, L., V. Ambrogi, F. Angelici, M. Ricci, S. Giovagnoli, M. Capuccella et C. Rossi. 2004a. «Development of mucoadhesive patches for buccal administration of ibuprofen». *J. Control. Release*, vol. 99, p. 73-82.
- Perioli, L., V. Ambrogi, D. Rubini, S. Giovagnoli, M. Ricci, P. Blasi et C. Rossi. 2004b. «Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease». *J. Control. Release*, vol. 95, p. 521-533.
- Perry, G. H., N. J. Dominy, K. G. Claw, A. S. Lee, H. Fiegler, R. Redon, J. Werner, F. A. Villanea, J. L. Mountain, R. Misra, N. P. Carter, C. Lee et A. C. Stone. 2007. «Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation». *Nat. Gen.*, vol. 39, p. 1256-1260.
- Pidgeon, C., S. Ong, H. Liu, X. Qiu, M. Pidgeon, A. H. Dantzig, J. Munroe, W. J. Hornback et J. S. Kasher. 1995. «IAM chromatography: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability». *J. Med. Chem.*, vol. 38, p. 590-594.

- Pifferi, G., P. Santoro et M. Pedrani. 1999. «Quality and functionality of excipients». *Farmaco*, vol. 54, p. 1-14.
- Ponchel, G., et J.-M. Irache. 1998. «Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 34, p. 191-219.
- Pouton, C. W. 2006. «Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system». *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 29, p. 278-287.
- Prankerd, R. J. 2007. «Appendix B». In *Profiles of drug substances, excipients and related methodology*, H. G. Brittain, p. 425-626. London: Academic Press.
- Prego, C., M. Garcia, D. Torres et M. J. Alonso. 2005. «Transmucosal macromolecular drug delivery». *J. Controlled Release*, vol. 101, p. 151-162.
- Preiss, J. 2004. «Plant starch synthesis». In *Starch in food*, A.-C. Eliasson, p. 17-70. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Qui, Y., et G. Zhang. 2000. «Research and developments aspects of oral controlled-release dosage forms». In *Handbook of pharmaceutical controlled release technology*, D. L. Wise, p. 465-504. New York, NY, USA: Marcel Dekker.
- Ragheb, A. A., I. Abd El-Thalouth et S. Tawfik. 1996. «Gelatinization of thermally treated starch mixed with sodium hydroxide in the solid state». *Starch - Stärke*, vol. 48, p. 57-64.
- Ragheb, A. A., I. Abdel-Thalouth et S. Tawfik. 1995. «Gelatinization of starch in aqueous alkaline solutions». *Starch - Stärke*, vol. 47, p. 338-345.
- Ragheb, A. A., H. S. El-Sayiad et A. Hebeish. 1997. «Preparation and characterization of carboxymethyl starch (CMS) products and their utilization in textile printing». *Starch - Stärke*, vol. 49, p. 238-245.
- Rahmouni, M., F. Chouinard, F. Nekka, V. Lenaerts et J. C. Leroux. 2001. «Enzymatic degradation of cross-linked high amylose starch tablets and its effect on in vitro release of sodium diclofenac». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 51, p. 191-198.
- Ranade, V. V., et M. A. Hollinger. 2004. *Drug delivery systems*, Second. New York, NY, USA: CRC Press, 433 p.
- Ratnayake, W. S., D. S. Jackson et L. T. Steve. 2008. «Starch gelatinization». In *Advances in food and nutrition research vol. 55*, L. Taylor Steve, p. 221-268. San Diego: Academic Press.

- Rege, B. D., L. X. Yu, A. S. Hussain et J. E. Polli. 2001. «Effect of common excipients on Caco-2 transport of low-permeability drugs». *J. Pharm. Sci.*, vol. 90, p. 1776-1786.
- Reza, S., M. A. Quadir et S. S. Haider. 2003. «Comparative evaluation of plastic, hydrophobic and hydrophilic polymers as matrices for controlled-release drug delivery». *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, vol. 6, p. 282-291.
- Rios, M. 2006. «Debating excipient functionality». *Pharm. Technol.*, vol. 30, p. 50-60.
- Ritger, P. L., et N. A. Peppas. 1987. «A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices». *J. Control Release*, vol. 5, p. 37-42.
- Robyt, J. F. 2008. «Starch: Structure, Properties, Chemistry, and Enzymology Glycoscience». Bertram O. Fraser-Reid, Kuniaki Tatsuta et Joachim Thiem, p. 1437-1472: Springer Berlin Heidelberg. En ligne. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-30429-6_35>.
- Rodriguez-Boulan, E., et W. Nelson. 1989. «Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype». *Science*, vol. 245, p. 718-725.
- Rowe, R. C., P. J. Sheskey et S. C. Owen. 2006. *Handbook of pharmaceutical excipients*, 5th London, UK: Pharmaceutical Press, 850 p.
- Russell, T. L., R. R. Berardi, J. L. Barnett, L. C. Dermentzoglou, K. M. Jarvenpaa, S. P. Schmaltz et J. B. Dressman. 1993. «Upper gastrointestinal pH in seventy-nine healthy, elderly, North American men and women». *Pharm. Res.*, vol. 10, p. 187-196.
- Rutten, M., D. Rattner et W. Silen. 1985. «Transepithelial transport of guinea pig gastric mucous cell monolayers». *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, vol. 249, p. C503-C513.
- Saltzman, W. M. 2001. *Engineering principles for drug therapy*. New York, New York, USA: Oxford university press p.
- Sam, A. P., et J. G. Fokkens. 1997. «Drug delivery system: Adding therapeutic and economic value to pharmacotherapy. Part 2». *Pharm. Tech. Eur.*, vol. 9, p. 58-66.
- Sangseethong, K., S. Ketsilp et K. Sriroth. 2005. «The role of reaction parameters on the preparation and properties of carboxymethyl cassava starch». *Starch - Stärke*, vol. 57, p. 84-93.
- Sante Canada. 2011. *List of Codes for all Routes of Administration, Drugs and Health Products, en ligne* <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mpps/prodpharma/notices-avis/abbrev-abrev/route_voie_administration-eng.php>, Consulté le 5 janvier 2011.

- Sarko, A., et H.-C. H. Wu. 1978. «The crystal structures of A-, B- and C-polymorphs of amylose and starch». *Starch - Stärke*, vol. 30, p. 73-78.
- Schwartz, E. D., J. S. Shumsky, S. Wehrli, A. Tessler, M. Murray et D. B. Hackney. 2003. «Ex vivo MR determined apparent diffusion coefficients correlate with motor recovery mediated by intraspinal transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF». *Exp. Neurol.*, vol. 182, p. 49-63.
- Semaan, F. S., A. J. dos Santos Neto, F. M. Lanças et E. T. G. Cavaleiro. 2005. «Rapid HPLC-DAD determination of furosemide in tablets using a short home-made column». *Anal. Lett.*, vol. 38, p. 1651-1658.
- Seufert, K., et J. Zeleznik. 2009. «The attractive economics of high-functionality excipients». *Tablets and Capsules*, vol. 7, p. 10-14.
- Shaji, S., S. T. Pasha, S. Srinivasan et S. Ray. 2009. «Design and optimization of a multiparticulate gastroretentive dosage form for better control of gastric acidity». *J. Pharm. Sci. Tech.*, vol. 1, p. 40-47.
- Shargel, L., S. Wu-Pong et A. B. C. Yu. 2004. *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*, Fifth edition. New York, New York, USA: McGraw-Hill, 892 p.
- Shargel, L., et A. B. C. Yu. 2007. «Biopharmaceutics». In *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, Third edition, James Swarbrick, p. 208-227. New York, NY, USA: Informa Healthcare USA.
- Shaw, J. E. 1980. «Drug delivery systems». In *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Vol. 15, H.-J. Hess, p. 302-315. New York, NY, USA: Academic Press Inc.
- Shi, Y.-C., T. Capitani, P. Trzasko et R. Jeffcoat. 1998. «Molecular structure of a low-amylopectin starch and other high-amylose maize starches». *J. Cereal Sci.*, vol. 27, p. 289-299.
- Shiftan, D., F. Ravenelle, M. A. Mateescu et R. H. Marchessault. 2000. «Change in the V/B polymorph ratio and T_1 relaxation of epichlorohydrin crosslinked high amylose starch excipient». *Starch - Stärke*, vol. 52, p. 186-195.
- Shin, K., V. C. Fogg et B. Margolis. 2006. «Tight junctions and cell polarity». *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 22, p. 207-235.
- Siepmann, J., et A. Göpferich. 2001. «Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 48, p. 229-247.
- Siepmann, J., et N. A. Peppas. 2000. «Hydrophilic matrices for controlled drug delivery: an improved mathematical model to predict the resulting drug release kinetics (the "sequential layer" model)». *Pharm. Res.*, vol. 17, p. 1290-1298.

- , 2001. «Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 48, p. 139-157.
- Singh, A. V., L. K. Nath, M. Guha et R. Kumar. 2011. «Microwave assisted synthesis and evaluation of cross-linked carboxymethylated sago starch as superdisintegrant». *Pharm. Pharmacol.*, vol. 2, p. 42-46.
- Smart, J. D. 2005. «The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, p. 1556-1568.
- Smith, A. M., K. Denyer et C. Martin. 1997. «The synthesis of the starch granule». *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 48, p. 67-87.
- Spencer, G. E., C. F. Spraggs, R. Stables et B. H. Hirst. 1992. «Transmucosal electrical resistance in rabbit isolated gastric mucosa during exposure to acid». *J. Physiol.*, vol. 449, p. 169-181.
- Standring, S. 2009. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*, 40 th edition. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Churchill Livingstone 1576 p.
- Stella, V. J., et R. A. Rajewski. 1997. «Cyclodextrins: Their Future in Drug Formulation and Delivery». *Pharm. Res.*, vol. 14, p. 556-567.
- Stevenson, B., et D. Begg. 1994. «Concentration-dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDCK epithelial cells». *J. Cell Sci.*, vol. 107, p. 367-375.
- Stojanovic, Z., K. Jeremic et S. Jovanovic. 2000. «Synthesis of carboxymethyl starch». *Starch - Starke*, vol. 52, p. 413-419.
- Stojanovic, Z., K. Jeremic, S. Jovanovic et M. D. Lechner. 2005. «A comparison of some methods for the determination of the degree of substitution of carboxymethyl starch». *Starch - Stärke*, vol. 57, p. 79-83.
- Sun, C. C. 2008. «Mechanism of moisture induced variations in true density and compaction properties of microcrystalline cellulose». *Int. J. Pharm.*, vol. 346, p. 93-101.
- Sutton, L., A. Cato et A. I. Cato. 2007. «Clinical evaluation of drugs». In *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, Third edition, James Swarbrick, p. 560-571. New York, NY, USA: Informa Healthcare USA.
- Taggart, P. 2004. «Starch as an ingredient: manufacture and applications». In *Starch in food*, A.-C. Eliasson, p. 373-402. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.

- Takahashi, H., R. Chen, H. Okamoto et K. Danjo. 2005. «Acetaminophen particle design using chitosan and a spray-drying technique». *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 53, p. 37-41.
- Talukder, R., et R. Fassihi. 2004. «Gastroretentive delivery systems: A mini review». *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 30, p. 1019-1028.
- Taub, M. E., L. Podila, D. Ely et I. Almeida. 2005. «Functional assessment of multiple P-glycoprotein (P-GP) probe substrates: Influence of cell line and modulator concentration on P-GP activity». *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 33, p. 1679-1687.
- Tavelin, S., J. Gråsjö, J. Taipalensuu, G. Ocklind et P. Artursson. 2002. «Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport». In *Epithelial Cell Culture Protocols*, Clare Wise, p. 233-272. Totowa: Humana Press.
- Te Wierik, G. H. P., A. C. Eissens, J. Bergsma, A. W. Arends-Scholte et C. F. Lerk. 1997. «A new generation of starch products as excipient in pharmaceutical tablets. II. High surface area retrograded pregelatinized potato starch products in sustained-release tablets». *J. Control. Release*, vol. 45, p. 25-33.
- Tétreault, M.-P., P. Chailier, N. Rivard et D. Ménard. 2005. «Differential growth factor induction and modulation of human gastric epithelial regeneration». *Exp. Cell. Res.*, vol. 306, p. 285-297.
- Thomas, V. H., S. Bhattachar, L. Hitchingham, P. Zocharski, M. Naath, N. Surendran, C. L. Stoner et A. El-Kattan. 2006. «The road map to oral bioavailability: an industrial perspective». *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 2, p. 591-608.
- Tijssen, C. J., H. J. Kolk, E. J. Stamhuis et A. A. C. M. Beenackers. 2001. «An experimental study on the carboxymethylation of granular potato starch in non-aqueous media». *Carbohydr. Polym.*, vol. 45, p. 219-226.
- Tijssen, C. J., H. J. Scherpenkate, E. J. Stamhuis et A. A. C. M. Beenackers. 1999. «Optimisation of the process conditions for the modification of starch». *Chem. Eng. Sci.*, vol. 54, p. 2765-2772.
- Tijssen, C. J., R. M. Voncken et A. A. C. M. Beenackers. 2001. «Design of a continuous process for the production of highly substituted granular carboxymethyl starch». *Chem. Eng. Sci.*, vol. 56, p. 411-418.
- Tiwari, S. B., et A. R. Rajabi-Siahboomi. 2008. «Extended-release orale drug delivery technologies: monolithic matrix systems». In *Drug delivery systems*, K. K. Jain, p. 217-243. Totowa, NJ, USA: Humana.
- Tortora, G. J., et S. R. Grabowski. 2000. *Principes d'anatomie et de physiologie*. St-Laurent, Qc, Canada: Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 1121 p.

- Trivedi, N. R., M. G. Rajan, J. R. Johnson et A. J. Shukla. 2007. «Pharmaceutical approaches to preparing pelletized dosage forms using the extrusion-spheronization process». *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, vol. 24, p. 1-40.
- Troyanovsky, R. B., J. Klingelhofer et S. Troyanovsky. 1999. «Removal of calcium ions triggers a novel type of intercadherin interaction». *J. Cell Sci.*, vol. 112, p. 4379-4387.
- Tu, J., Y. Shen, R. Mahalingam, B. Jasti et X. Li. 2010. «Polymers in oral modified release systems». In *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery: Theory to Practice*, , p. 71-87: John Wiley & Sons, Inc. En ligne. <<http://dx.doi.org/10.1002/9780470640487.ch5>>.
- Tuovinen, L., S. Peltonen, M. Liikola, M. Hotakainen, M. Lahtela-Kakkonen, A. Poso et K. Jarvinen. 2004a. «Drug release from starch-acetate microparticles and films with and without incorporated [alpha]-amylase». *Biomaterials*, vol. 25, p. 4355-4362.
- Tuovinen, L., E. Ruhanen, T. Kinnarinen, S. Ronkko, J. Pelkonen, A. Urtti, S. Peltonen et K. Jarvinen. 2004b. «Starch acetate microparticles for drug delivery into retinal pigment epithelium--in vitro study». *J. Control Release*, vol. 98, p. 407-413.
- Uchizono, J. A. 2010. «Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the design of controlled delivery systems». In *Oral controlled release formulation design and drug delivery*, Xiaoling Li et Bhaskara Jasti, p. 2-39. New York, New York, USA: McGraw-Hill.
- Ugwoke, M. I., R. U. Agu, N. Verbeke et R. Kinget. 2005. «Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives». *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, p. 1640-1665.
- Uhrich, K. E., S. M. Cannizzaro, R. S. Langer et K. M. Shakesheff. 1999. «Polymeric Systems for Controlled Drug Release». *Chem. Rev.*, vol. 99, p. 3181-3198.
- Umamaheshwari, R. B., S. Jain et N. K. Jain. 2003. «A new approach in gastroretentive drug delivery system using cholestyramine». *Drug Delivery*, vol. 10, p. 151-160.
- Urtti, A. O., S. H. Peltonen, T. P. Paronen, L. J. Nakari et J.-E. Vuorenmaa. 1995. «Composition for pH dependent controlled release of active ingredients and methods for producing it». United States
- US Department of Health and Human Services. 1992. *Route of Administration in Food and Drug Administration, Investigational New Drug Application, Data Standards Manual (monographs)*, Rockville, MD, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).

- , 2000. *Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system*, Rockville, MD, Center for Drug Evaluation and Research (CDER)..
- , 2005. *Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Nonclinical studies for safety evaluation of pharmaceutical excipients*, Rockville, MD, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
- US Pharmacopeial Convention. 2012. *United States Pharmacopeia (USP) XXXV*. Rockville, MD, USA.
- Van de Waterbeemd, H., et B. Testa. 2007. «The why and how of absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity research». In *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, B. Taylor John et J. Trigg David, p. 1-9. Oxford: Elsevier.
- Van der Voort Maarschalk, K., H. Vromans, W. Groenendijk, G. K. Bolhuis et C. F. Lerk. 1997. «Effect of water on deformation and bonding of pregelatinized starch compacts». *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 44, p. 253-260.
- Vasir, J. K., K. Tambwekar et S. Garg. 2003. «Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system». *Int. J. Pharm.*, vol. 255, p. 13-32.
- Volkert, B., F. Loth, W. Lazik et J. Engelhardt. 2004. «Highly substituted carboxymethyl starch». *Starch - Stärke*, vol. 56, p. 307-314.
- Volpe, D. A. 2008. «Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays». *J. Pharm. Sci.*, vol. 97, p. 712-725.
- Wang, B., T. Siahaan et R. Soltero. 2005. *Drug delivery : principles and applications* Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 461 p.
- Wang, T., T. Bogracheva et C. Hedley. 1998. «Review article. Starch: as simple as A, B, C?». *J. Exp. Bot.*, vol. 49, p. 481-502.
- Wang, Z., et R. A. Schmeis. 2010. «Dissolution controlled drug delivery systems». In *Oral controlled release formulation design and drug delivery*, Xiaoling Li et Bhaskara Jasti, p. 154-172. New York, New York, USA: McGraw-Hill.
- Wanous, M. P. 2004. «Texturizing and stabilizing by gum! ». *Prep. Foods.*, vol. January, p. 108-118.
- Washington, N., C. Washington et C. G. Wilson. 2001. *Physiological Pharmaceutics : Barriers to Drug Absorption*, Second edition. New York, NY, USA: Taylor and Francis, 328 p.

- Wen, H., et K. Park. 2010a. «Introduction and overview of oral controlled release formulation design». In *Oral controlled release formulation design and drug delivery*, H. Wen et K. Park, p. 1-19: John Wiley & Sons, Inc.
- , 2010b. *Oral controlled release formulation design and drug delivery*. Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 359 p.
- Wen, X., A. Nokhodchi et A. Rajabi-Siahboomi. 2010. «Oral extended release hydrophilic matrices: formulation and design». In *Oral controlled release formulation design and drug Delivery*, p. 89-100: John Wiley & Sons, Inc.
- Wu, Z. 2011. «Reaction kinetics of carboxymethylation of cornstarch». *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 121, p. 1901-1907.
- Wurzburg, O. B. 1986. «Introduction». In *Modified starches: properties and uses*, Otto B Wurzburg, p. 4-15. Boca Raton: CRC Press.
- Xuan, D., et S. Y. Choe. 2007. «Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling and simulations in drug development». In *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, Third edition, James Swarbrick, p. 2802-2815. New York, NY, USA: Informa Healthcare USA.
- Yang, L., J. S. Chu et J. A. Fix. 2002. «Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation». *Int. J. Pharm.*, vol. 235, p. 1-15.
- Youdim, K. A., A. Avdeef et N. J. Abbott. 2003. «In vitro trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions». *Drug Discov. Today*, vol. 8, p. 997-1003.
- Zanowiak, P. 2000. Pharmaceutical dosage forms. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Zaware, S. R., P. D. Gaikwad, V. H. Bankar et S. P. Pawar. 2010. «A Review on floating drug delivery system». *Int. J. Ph. Sci.*, vol. 2, p. 834-847.
- Zhang, H., et J. M. Surian. 2010. «Biopharmaceutic consideration and assessment for oral controlled release formulations». In *Oral controlled release formulation design and drug delivery*, H. Wen et K. Park, p. 33-45: John Wiley & Sons, Inc. En ligne. <<http://dx.doi.org/10.1002/9780470640487.ch3>>.
- Zhang, Y. H. P., B. R. Evans, J. R. Mielenz, R. C. Hopkins et M. W. W. Adams. 2007. «High-Yield Hydrogen Production from Starch and Water by a Synthetic Enzymatic Pathway». *PLoS ONE*, vol. 2, p. e456.
- Zhongdong, L. 1998. «Preparation of wheat carboxymethyl starch (CMS) under microwave and the structural analysis». *Chem. Reactn. Eng. Technol.*, vol. 14, p. 243-250.

- Zhongdong, L., L. Peng et J. F. Kennedy. 2005. «The technology of molecular manipulation and modification assisted by microwaves as applied to starch granules». *Carbohydr. Polym.*, vol. 61, p. 374-378.
- Zhu, Y., R. G. Minet et T. T. Tsotsis. 1996. «A continuous pervaporation membrane reactor for the study of esterification reactions using a composite polymeric/ceramic membrane». *Chem. Eng. Sci.*, vol. 51, p. 4103-4113.
- Zobel, H. F. 1988a. «Molecules to granules: A comprehensive starch review». *Starch - Stärke*, vol. 40, p. 44-50.
- , 1988b. «Starch crystal transformations and their industrial importance». *Starch - Stärke*, vol. 40, p. 1-7.
- Zobel, H. F., et A. M. Stephen. 1995. «Starch: Structure, analysis, and application». In *Food polysaccharides and their applications*, A. M. Stephen, p. 19-66. New York, New York, USA: Marcel Dekker.